STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER Fc-γ-REZEPTOREN AUF RATTENMASTZELLEN UND RATTEN-BASOPHILEN LEUKÄMIEZELLEN. IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE ALLERGISCHE REAKTION VOM SOFORTTYP.

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Abteilung Biologie der
Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

GERD MÖLLER

im Juli 1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544708_0042

STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER Fc-γ-REZEPTOREN AUF RATTENMASTZELLEN UND RATTEN-BASOPHILEN LEUKÄMIEZELLEN. IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE ALLERGISCHE REAKTION VOM SOFORTTYP.

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Abteilung Biologie der
Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

GERD MÖLLER

im Juli 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Für Elisabeth, Hali und meine Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Ruhr-Universität Bochum (Direktor: Prof. Dr. W. Opferkuch) in der Arbeitsgruppe für Infektabwehrmechanismen unter der Leitung von Prof. Dr. W. König angefertigt.

Herrn Prof. Dr. König danke ich für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung.

Herrn Dipl. Biol. B. Krippl danke ich für seine Hilfe bei der Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. F. Falkenberg bin ich für seine Hilfe bei der Herstellung monoklonaler Antikörper zu Dank verpflichtet.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in der Zeitschrift "Immunology":

Immunology 43, 255 (1981)
Immunology 41, 605 (1980)

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.81

Referent: Prof. Dr. W. König
Korreferent: Prof. Dr. R. Berzborn

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. Abkürzungen 1

B. Einleitung 3

1. Einführung in den Begriff der Überempfindlichkeit 3

2. Die allergischen Reaktionen 3

2.1. Die anaphylaktische Reaktion 3

2.1.1. Regulation und sekundäre Effektormechanismen 5

2.2. Die zytotoxische Reaktion 7

2.3. Die komplexvermittelte Reaktion 8

2.3.1. Immunkomplexe und Komplement 9

2.3.2. Immunkomplexe und Fc-Rezeptoren 10

2.3.3. Die pathophysiologische Bedeutung von Immunkomplexen 12

2.4. Die verzögerte Reaktion (Typ IV) 14

3. Betrachtungen zur Struktur und Funktion von Fc-Rezeptoren 15

3.1. Allgemeine Bemerkungen 15

3.2. Verbreitung von Fc-Rezeptoren 16

3.3. Struktur 18

3.4. Funktionen 19

4. IgE-Rezeptor und Anaphylaxie 20

4.1. Struktur des IgE 21

4.2. Aktivierung von Mastzellen und Basophilen 22

4.3. Allergische Reaktionsbereitschaft und Desensibilisierung 23

4.4. Struktur des IgE-Rezeptors 26

5. Die Rolle von Fc-γ-Rezeptoren bei der Typ I Reaktion 28

6. Problemstellung 29

Seite

C. Material und Methoden 32

I. Material 32

1. Puffer und Lösungen 32
1.1. Physiologische Puffer 32
1.2. Puffer für die SDS-PAGE 34
1.3. Puffer für den elektrophoretischen Proteintransfer (Western-Blot) 35
1.4. Puffer für den direkten immunologischen Nachweis des Rezeptors im Polyacrylamidgel 35
1.5. Puffer für den ELISA 36
1.6. Puffer für die Immunpräzipitation 36
1.7. Reagenzien für die Immunelektrophorese und Agardiffusionstests 37
1.8. Reagenzien für die Proteinbestimmung nach Lowry 37

2. Medien zur Zellzüchtung 38

II. Methoden

1. Immunglobuline der Ratte 39
2. Infektion von Ratten mit Nip. bras. 40
3. Gewinnung von Nip. bras.-Antigen 40
4. Antiseren 40
5. Markierung von Proteinen mit ^{125}J 43
6. Herstellung von hitzeaggregiertem IgGa 43
7. Radioimmunassay (RIA) 46
8. Kopplung von h.a.IgGa an Schafserythrozyten 48
9. Herstellung von Ambozeptor-beladenen Schafserythrozyten 50
10. Hämagglutinationsassay 50
11. Präparation von Immunkomplexen 51
11.1. Herstellung von Immunadsorbentien zur Isolierung antigen-spezifischer Antikörper 51
11.2. Präzipitationskurve nach Heidelberger 51

Seite

12. Kultivierung von RBL-Zellen 52
13. Präparation von Ratten-Mastzellen 52
14. Methoden zum Nachweis der IgGa-Rezeptor-Interaktion 53
14.1. Immunfluoreszenz 53
14.2. Rosettenassay 54
14.3. Bindungsstudien mit ^{125}J-markierten Proteinen 54
15. Biologische Analytik 54
15.1. Messung des Calcium-Einstroms in RBL- und Mastzellen 54
15.2. Messung der Histaminsekretion von Mastzellen 55
16. Herstellung monoklonaler Antikörper 56
16.1. Immunisierung von Mäusen 56
16.2. RBL-Agglutinationsassay 57
16.3. Kultivierung der Plasmozytomlinie 57
16.4. Fusion 58
16.5. Selektion der Hybridomzellen in HAT-Medium 58
16.6. Austestung der Klonüberstände 60
16.7. Charakterisierung der Isotypen 61
16.8. Soft-Agar-Cloning 61
16.9. Herstellung von Ascites 62
16.10. Anreinigung monoklonaler Antikörper aus dem Ascites durch Gelchromatographie 63
16.11. Einfrieren von Zellen 63
16.12. ELISA 65
17. Methoden zur Charakterisierung des Fc-γ-Rezeptors 66
17.1. Enzymatische Markierung von Zellmembranen mit ^{125}J 66
17.2. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) 67

Seite

17.3. Autoradiografie 67
17.4. Molekulargewichtsbestimmungen 67
17.5. Immunpräzipitation 68
17.6. Elektrophoretischer Proteintransfer aus SDS-Polyacrylamidgelen in Nitrocellulosefilter 69
17.7. Direkter immunologischer Nachweis des Rezeptors in SDS-Polyacrylamidgelen 71
18. Proteinbestimmung 71
19. Immunelektrophorese 72
20. Immundiffusion nach Ouchterlony 73

D. Ergebnisse

I. Nachweis des Fc-γ-Rezeptors auf Mastzellen und RBL-Zellen durch Rosettentechnik und indirekte Immunfluoreszenz 74
1. Rosettentechnik 74
2. Indirekte Immunfluoreszenz 78
II. Bindungsstudien mit ^{125}J-markiertem h.a.IgGa an Mast- und RBL-Zellen 78
1. Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Bindung 79
2. Der Einfluß des pH 82
3. Die Rolle von Ca^{++}-Ionen 88
4. Dosis-Wirkungsstudien 88
5. Kompetitionsexperimente 92
5.1. Wechselwirkung von h.a.IgGa und ^{125}J-IgE 93
6. Inhibition durch Protein A 98
7. Berechnung der Zahl der gebundenen Moleküle pro Zelle 99
III. Bindung definierter Immunkomplexe an RBL-Zellen 101
1. Analyse löslicher Immunkomplexe im Sucrose-Dichtegradienten 101

Seite

2. Isolierung von Immunkomplexen definierter Größe 105

3. Bindungsstudien mit definierten Immunkomplexen an RBL-Zellen 109

3.1. Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Bindung 109

3.2. Der Einfluß des pH 109

3.3. Studien zur Bindungsaffinität 111

IV. Untersuchungen zur biologischen Wirksamkeit des IgGa 114

1. Modulation des Ca^{++}-Einstroms in RBL- und Mastzellen 115

1.1. Kinetik des Einstroms und Modulation durch h.a.IgGa 117

1.2. Dosis-Wirkungsstudien an normalen Mastzellen und RBL-Zellen 117

1.3. Modulation des IgE-mediierten Ca^{++}-Einflusses 120

2. Modulation der Histaminsekretion an Mastzellen durch h.a.IgGa 126

2.1. Der Einfluß des IgGa auf die Histaminsekretion an normalen Mastzellen 126

2.2. Modulation der IgE-vermittelten Sekretionsleitung 128

V. Versuche zur Reinigung des Fc-γ-Rezeptors 131

1. Isolation des Rezeptors durch Immunpräzipitation mit h.a.IgGa und anti-IgGa 131

2. Versuch der Charakterisierung durch monoklonale Antikörper 133

2.1. Herstellung von Hybridomzellen 133

2.2. Austestung der Kulturüberstände 133

2.2.1. Indirekte Immunfluoreszenz 133

2.2.2. ^{125}J-h.a.IgGa Inhibitionstest 135

2.3. Charakterisierung der Isotypen 135

Seite

2.4. Herstellung und Präparation von Ascites 136

2.4.1. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 136

2.4.2. Kompetition mit der ^{125}J-h.a.IgGa-Bindung 137

2.5. Präzipitation des Rezeptors mit anti-Fc-γ -Rezeptor und Staphylococcus aureus 141

2.6. Versuch der Charakterisierung durch den "Western-Blot" 144

2.7. Versuch des direkten immunologischen Nachweises in Polyacrylamidgelen 145

E. Diskussion

1. Rosetten- und Fluoreszenzversuche 146

2. Bindungskinetik 147

3. Der Einfluß des pH 148

4. Kompetitionsexperimente 150

4.1. Kompetition von h.a.IgGa mit der Bindung von ^{125}J-h.a.IgGa 150

4.2. Kompetition von h.a.IgGa mit der Bindung von ^{125}J-IgE 152

5. Berechnung der gebundenen h.a.IgGa-Moleküle pro RBL-Zelle 154

6. Inhibition der h.a.IgGa-Bindung durch Protein A 158

7. Abhängigkeit der Liganden-Rezeptorbindung von der Ca^{++}-Konzentration des Mediums 159

8. Die Bindung von Immunkomplexen an RBL-Zellen 159

9. Modulation der Mediatorensekretion durch h.a.IgGa 161

10. Versuche zur Reinigung des Fc-γ-Rezeptors 164

10.1. Solubilisierung des Rezeptors nach Ligandenbindung 164

10.2. Isolierung mit monoklonalen Antikörpern 164

Seite

11. Zur Identität von Fc-ε - und Fc-γ-Rezeptor 168
12. Abschließende Bemerkungen 170

F. Zusammenfassung 172

G. Literaturverzeichnis 175

A. Abkürzungen

A	Albumin
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BBS	Borate Buffered Saline
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosin-monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-monophosphat
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxyd
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h.a.	hitzeaggregiert
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N-2-äthansulfonsäure
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HLA	Human leukocyte antigen; Produkt der genetischen Histokompatibilitätsregion des Menschen
HSA	Human Serum Albumin
HT	Hypoxanthin-Thymidin
Ia	I-Region assoziierte Antigene; Antigene, die durch Ir-Gene (Immune response Gene) kontrolliert werden
i.c.	intrakutan
Ig	Immunglobulin
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IU	Internationale Einheit
K-Zellen	Killer-Zellen
(m)M	(milli)Mol
min	Minute

µg	microgramm
NET	Natrium-EDTA-Tris
ng	nanogramm
Nip. bras.	Nippostrongylus brasiliensis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Passiv kutane Anaphylaxie
PEG	Polyäthylenglykol
PMSF	Phenylmethyl-sulfonylfluorid
RBL	Ratten-basophile Leukämie
RIA	Radioimmunoassay
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
SRBC	Schafserythrozyten
St.	Stunden
TCM	Tris-Calcium-Magnesium
TEMED	N, N, N', N',-Tetramenthyläthylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VBS	Veronal-Buffered Saline

B. Einleitung

B. 1. Einführung in den Begriff der Überempfindlichkeit

Im traditionellen Verständnis stellt die Immunreaktion einen Organismus auf das Eindringen fremder Stoffe, sogenannter Antigene, eine Schutzmaßnahme dar, deren Zweck in der Elimination des Fremdkörpers und dem Schutz des Wirtsorganismus besteht. Heute weiß man, daß diese einseitige Betrachtungsweise falsch ist, da Immunreaktionen sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene Formen annehmen können, die den ursprünglichen Nutzeffekt in sein Gegenteil verkehren und somit dem Körper schaden. Systemische oder lokale Gewebsschäden sind die Folge. Diese als Überempfindlichkeit oder Allergie des Immunsystems bezeichneten Erscheinungen wurden von Coombs und Gell nach ihrem Wirkungsmechanismus in vier klassischen Typen eingeteilt (1975):

Typ I: Überempfindlichkeit vom Soforttyp oder anaphylaktische Reaktion

Typ II: Zytotoxische Reaktionen

Typ III: komplexvermittelte Überempfindlichkeit

Typ IV: verzögerte oder zellvermittelte Überempfindlichkeit.

Es sollte allerdings betont werden, daß diese Klassifizierung keine statische, sondern eine sehr dynamische ist, weil die für die jeweiligen Reaktionen typischen Mechanismen durchaus nicht strikt voneinander getrennt werden können, sondern in den meisten Fällen ineinander übergreifen und sich gegenseitig ergänzen. Im folgenden sollen die vier Typen der Überempfindlichkeit im Detail dargestellt werden.

B. 2. Die allergischen Reaktionen

B. 2.1. Die anaphylaktische Reaktion

Der Kontakt eines Organismus mit einem Fremdstoff führt bei

einem Erstkontakt zu einer immunologischen Abwehrreaktion sowohl auf humoraler als auch auf zellulärer Ebene. Der Organismus wehrt sich gegen den Eindringling. Kommt es zu einem Zweitkontakt, so treten unter Umständen Reaktionen auf, die man zusammenfassend als anaphylaktische oder Überempfindlichkeit vom Soforttyp bezeichnet. Es kommt hier im wesentlichen zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur und einer Erweiterung der Kapillaren: Kontraktion der Bronchiole und Bronchien, Krämpfe des Gastrointestinaltraktes und Diarrhoe, Hypotension des kardiovaskulären Systems und schließlich Schock.

Vermittler all dieser Reaktionen sind pharmakologisch aktive Substanzen, sogenannte Mediatoren der allergischen Entzündung, die aus Zellen im Gewebe und Blut freigesetzt werden, insbesondere aus Mastzellen und basophilen Leukozyten. Je nach Applikation des Antigens sind die auftretenden Reaktionen lokal oder systemisch. Mastzellen und basophile Leukozyten zeigen eine hohe Spezifität der Bindung für das Immunglobulin E (IgE), welches sich über sein Fc-Stück an seinen korrespondierenden Rezeptor auf der Zellmembran binden kann und als eigentlicher Träger der allergischen Reaktionsbereitschaft angesehen wird (König, 1977; König, Möller und Theobald, 1979).

Nach Kontakt des Antigens mit dem zellständigen IgE kommt es zur Aktivierung der Zielzelle. Die Antigenbindung führt zu einem "patching", d. h. Zusammenfließen von Rezeptoren. Die hierbei entstehende Membranperturbation führt unter anderem zum Einstrom von Calcium in die Zelle und über eine Reihe von intrazellulären Vorgängen zur Mediatorensekretion, deren Ausmaß wiederum abhängig ist vom Gehalt an zyklischen Nukleotiden in der Zelle. So führt ein Anstieg der Konzentration des zyklischen AMP zu einer Verminderung, ein Anstieg des zyklischen GMP hingegen zu einer Erhöhung der Sekretionsleistung (Goldberg, 1975).

In neuerer Zeit gibt es allerdings Befunde, die darauf hinweisen, daß die Kopplung zwischen dem cAMP-Spiegel und der Sekretionsleistung nicht unbedingt obligatorisch ist (Holga

Winslow, Lewis und Austen, 1981). Die Autoren zeigten, daß Theophyllin zwei cAMP-abhängige Proteinkinasen aktivieren konnte und die Mediatorensekretion aus Mastzellen nahezu vollständig unterdrückte. Im Gegensatz dazu wurde durch Gabe von Prostaglandin D_2 zwar auch der cAMP-Spiegel in den Mastzellen erhöht, jedoch kam es nicht zur Enzymaktivierung und Modulation der Mediatorensekretion.

Die von Mastzellen und Basophilen ausgeschütteten Mediatoren lassen sich nach Austen und Orange (1975) in zwei Gruppen aufteilen, die präformierten und die neugenerierten. Präformiert sind das Histamin (5-2-aminoaethyl-imidazol), der eosinophil-chemotaktische Faktor der Anaphylaxie (ECF-A) - nach heutigen Vorstellungen ein Tetrapeptid - und der neutrophil-chemotaktische Faktor (NCF). Neu generiert werden die "Slow Reacting Substance of Anaphylaxis" (SRS-A), die als Leukotrien D u. E identifiziert wurde, der Thrombozytenaggregierende Faktor (PAF) und ein Lipid-eosinophil-chemotaktischer Faktor (ECF), der als Arachidonsäuremetabolit angesehen wird mit einem Molekulargewicht unter 1000dalton (Tesch, König und Frickhofen, 1979; Tesch und König, 1980). Das Histamin, das als Komplex mit Heparin in den Mastzellgranula vorliegt (Uvnäs, 1967), ist für erhöhte vaskuläre Permeabilität und Kontraktion der Darmmuskulatur verantwortlich. Die eosinophil- bzw. neutrophil-chemotaktischen Faktoren induzieren die Chemotaxis von eosinophilen bzw. neutrophilen Granulozyten zum Entzündungsort. Die Zellen besitzen Rezeptoren, mit deren Hilfe sie die chemotaktischen Faktoren erkennen und in Richtung des Konzentrationsanstiegs wandern können. Die Funktion der "Slow Reacting Substance of Anaphylaxis" wird in der Kontraktion der Bronchien sowie in der Gefäßpermeabilitätssteigerung gesehen. Der Plättchen-aggregierende Faktor (PAF) führt zu Thrombozytenaggregation, somit zu Thrombenbildung und zur Freisetzung von vasoaktiven Aminen wie Serotonin.

B. 2.1.1. Regulation und sekundäre Effektormechanismen

Die Regulation der Entzündungsreaktion ist sehr komplex. Ne-

ben der intrazellulären Kontrolle durch die zyklischen Nukleotide findet sie durch die sezernierten Mediatoren selbst vor allem Histamin, statt; außerdem bestehen interzelluläre Wechselwirkungen zwischen Mastzellen, basophilen Leukozyten und den durch chemotaktische Faktoren angelockten Zellen.

Die Mastzelle trägt auf ihrer Oberfläche neben dem Fc-Rezeptor für IgE noch andere Rezeptoren mit regulativer Funktion, den ß-adrenergen Rezeptor (z. B. für Epinephrin) und zwei Rezeptoren für Histamin, den H1- und den H2-Rezeptor (Zellen tragen überwiegend den H2-Rezeptor). ß-adrenerger Rezeptor und H2-Rezeptor aktivieren bei Interaktion mit ihren Liganden eine membranständige Adenylzyklase, die ATP in cAMP umwandelt, welches dann seinerseits die Mediatorensekretion hemmt (Lichtenstein und Gillespie, 1973). Die Wirkung des H1-Rezeptors ist bislang noch umstritten.

Die zum Entzündungsort wandernden Zellen - Eosinophile und Neutrophile - tragen ihrerseits zum Bild der allergischen Reaktion bei. Histaminase, ein Histamin-inaktivierendes Enzym, wird ebenso wie eine SRS-A spaltende Arylsulfatase von den Eosinophilen an die Umgebung abgegeben. Daneben inaktiviert eine sezernierte Phospholipase D den Thrombozytenaggregierenden Faktor.

Die Beteiligung der neutrophilen Granulozyten besteht darin, daß sie ebenso wie Mastzellen und mononukleäre Zellen in der Lage sind, Lipid-ECF und SRS-A zu sezernieren. Lysosomale Enzyme und kationische Proteine vervollständigen die Entzündungssymptomatik. Zur Aktivierung der Zellen kommt es entweder durch Phagozytose oder durch Kontakt mit den Komplementbruchstücken C3a und C5a, auch Anaphylatoxine genannt, die neben ihrer chemotaktischen Wirksamkeit auf eosinophile Granulozyten (C5a) auch zur Mediatorenfreisetzung aus Mastzellen führen, da diese korrespondierende Rezeptoren besitzen.

Festzuhalten ist, daß trotz des verwickelten Geschehens im Verlauf der Entzündung Mastzellen und basophile Leukozyten eine Schlüsselrolle einnehmen, da nur sie in der Lage sind, das IgE mit hoher Affinität zu binden und somit nach Antigenkontakt die beschriebenen Reaktionen in Gang zu setzen.

B. 2.2. Die zytotoxische Reaktion

Die diesem Typ der Überempfindlichkeit zugerechneten Reaktionen werden im klassischen Verständnis als zytotoxisch angesehen. Die vermittelnden Antikörper gehören den Klassen IgG und IgM an. Sie sind in der Lage, antigene Determinanten auf Zelloberflächen zu erkennen und sich mit ihnen zu verbinden. Daneben existiert auch die Möglichkeit, daß freie, nicht zellgebundene Antigene oder Haptene sich an Körperzellen oder Gewebeteile anheften können und erst nach diesem Schritt von entsprechenden Antikörpern erkannt werden.

Der zytotoxische Folgecharakter manifestiert sich durch verschiedene Mechanismen:

1. Die durch Antikörper besetzten Zellen sind der Phagozytose durch mononukleäre Zellen leichter zugänglich, da diese auf ihrer Zellmembran Rezeptoren für den Fc-Teil von Immunglobulinen besitzen (Fc-Rezeptoren) und somit die Antikörper beladene Zelle (opsonisierte Zelle) binden können. Hat eine Aktivierung des Komplementsystems stattgefunden, findet Immunadhärenz ebenfalls über die Bindung von C3b an spezifische Rezeptoren statt.

2. In den meisten Fällen wird nach der Antigen-Antikörperreaktion das Komplementsystem vollständig aktiviert und damit die Lyse der Zielzelle eingeleitet. Das wohl wichtigste klinische Problem dieser Art sind Transfusionsreaktionen, bei denen der Empfänger des Fremdblutes Antikörper gegen membranständige Antigene der transfundierten Erythrozyten besitzt. Rhesus-Inkompatibilität und Überempfindlichkeiten gegen gewisse Medikamente gehören ebenfalls hierher.

Im Falle von Haut- oder Organtransplantationen, die dem Primärangriff reaktiver Lymphozyten (Typ IV, zellvermittelte Überempflindlichkeit) nicht zum Opfer gefallen sind, kann es zu humoralen Reaktionen (Antikörperbildung) mit nachfolgender komplementbedingter Lyse der Zielzelle kommen.

3. Nach Untersuchungen von Perlmann, Perlmann und Wigzell (1972) gibt es noch einen anderen Mechanismus der Zytotoxizität, der vermittelt wird durch sogenannte "Killer"-Zellen (K-Zellen). Unter Ausschluß der Phagozytose sind diese K-Zellen in der Lage, durch Bindung der Antikörper bedeckten Zielzelle über Fc-Rezeptoren zu ihrer Lyse zu führen. Diese Reaktion wird allgemein auch als Antikörper abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität bezeichnet (ADCC) und spielt besonders in der Tumorimmunologie bei der Abstoßung von soliden Tumoren eine große Rolle. Die Natur der beteiligten Zellen ist bislang umstritten, ebenso wie die Rolle des Komplementsystems bei dieser Reaktion (Wells, 1980). Da die zytotoxischen Zellen weder T- noch B-Zellen zugeordnet werden können, wurden sie als K-Zellen bezeichnet.

Diese kurze Darstellung zeigt, wie komplex das immunologische Geschehen der Typ II Reaktion ist; jedoch werden alle geschilderten Mechanismen durch Komplement- bzw. Fc-Rezeptoren vermittelt.

B. 2.3. Die komplexvermittelte Reaktion

Dieser Typ der Überempfindlichkeit soll ebenso wie die anaphylaktische Reaktion genauer besprochen werden. In diesem Zusammenhang soll auf die allgemeine biologische Funktion von Immunkomplexen, den Trägern dieses Erscheinungsbildes, näher eingegangen werden.

Es ist bekannt, daß ein immunologisches Wirkprinzip der Antikörper in der Bildung von Komplexen mit dem korrespondierenden Antigen besteht. Bildung, Struktur und vor allem die biologischen Eigenschaften dieser Immunkomplexe werden von einer Reihe von Faktoren bestimmt. Wichtig sind die Natur des Antigens und des Antikörpers, ebenso wie die sekundäre Bindung von komplexreaktiven Molekülen wie Komplement (Cochrane und Koffler, 1973). Größe und Ladung der Antigenmoleküle, die Zahl der antigenen Determinanten, die an der Antigen-Antikörperreaktion teilnehmen, beeinflussen die Eigenschaften der Komplexe entscheidend. Klasse, Subklasse

und vor allem die Affinität des Antikörpers zum Antigen spielen ebenfalls eine große Rolle für die Zusammensetzung (Singer, 1957; Heidelberger und Pedersen, 1937) und - neben dem Konzentrationsverhältnis von Antigen und Antikörper - für die immunologische und pathologische Wirksamkeit (Sedlacek, 1980; Haakenstad und Mannik, 1977). So ist z. B. bekannt, daß Antikörper mit niedriger Avidität dazu tendieren, länger in der Zirkulation zu verbleiben als solche mit hoher Avidität (Lambert, 1979).

B. 2.3.1. Immunkomplexe und Komplement

Das relative Konzentrationsverhältnis von Antigen und Antikörper bestimmt neben Größe und Löslichkeit auch die Reaktivität der Komplexe mit Komplement. So konnten verschiedene Autoren zeigen, daß maximale Komplementaktivierung dann stattfand, wenn die Immunkomplexe in der Äquivalenzzone der Präzipitationskurve gebildet worden waren (Weigle und Maurer, 1957; Scherzer und Ward, 1978). Im Antigen- bzw. Antikörperüberschuß war die Aktivierung des Komplements geringer.

Immunkomplexe können Komplement sowohl über den klassischen als auch den alternativen Weg aktivieren und damit die Anaphylatoxine C3a und C5a freisetzen, die wiederum mit "ihren" Rezeptoren auf Mastzellen bzw. basophilen Leukozyten reagieren (Cochrane und Müller-Eberhard, 1968; Schorlemmer und Allison, 1976) und somit durch die Freisetzung von Mediatoren wie z. B. Histamin zum klassischen Bild der Überempfindlichkeit beitragen. Die Anaphylatoxine wirken außerdem chemotaktisch auf Neutrophile und Eosinophile.

Andererseits wird durch die Bindung von Komplementbruchstükken, speziell C4b (Cooper, 1969) und noch mehr durch C3b (Wellek, Hahn und Opferkuch, 1975) die Affinität von Immunkomplexen an Leukozyten erhöht, da diese entsprechende Rezeptoren für die Komplementkomponenten tragen. B-Lymphozyten (Ross, Polley, Rabellino und Grey, 1973), Monozyten und Makrophagen (Reynolds, Atkinson, Neuball und Frank, 1975; Ehlen-

berger und Nussenzweig, 1977) besitzen außerdem C3d-Rezeptoren, die eine zusätzliche Haftung der Immunkomplexe garantieren.

Da Thrombozyten ebenfalls C3b bzw. Fc-Rezeptoren besitzen (Henson, 1974, Henson und Spiegelberg, 1973), sind Immunkomplexe in der Lage, eine Plättchenaggregation zu bewirken und somit zur Freisetzung von Mediatoren der allergischen Entzüngung, z. B. Serotonin und Histamin, beizutragen.

Die aus C3 und C5 entstehenden Komplementbruchstücke können nicht nur durch Aktivierung des klassischen oder alternativen Aktivierungswegs entstehen, sondern auch durch die Wirkung lysosomaler Enzyme. So konnten Schorlemmer und Allison zeigen (1976), daß C3b in der Lage ist, mit Makrophagen und Granulozyten in dosisabhängiger Weise so zu reagieren, daß es zur Ausschüttung von lysosomalen Enzymen kommt, die ihrerseits in der Lage sind, noch mehr C3 zu spalten. Das dadurch entstehende C3b führt wiederum zur Freisetzung lysosomaler Enzyme und kann dadurch zu Gewebeschäden führen.

B . 2.3.2. Immunkomplexe und Fc-Rezeptoren

Eine wichtige Eigenschaft von Antikörpern bzw. Immunkomplexen, besonders solchen, an denen IgG beteiligt ist, ist ihre Fähigkeit, sich mit der Fc-Region an definierte Strukturareale auf Zelloberflächen zu binden, die sogenannten Fc-Rezeptoren (Paraskevas, Lee, Orr und Israels, 1972; Dorrington, 1976).

Solche Rezeptoren sind auf verschiedenen Zelltypen beschrieben worden, wie Makrophagen, Lymphozyten, Thrombozyten und Granulozyten (Kerbel und Davies, 1974; Dickler, 1976). Die Funktion dieser Rezeptoren steht in direktem Zusammenhang mit der Funktion der jeweiligen Zelle im immunologischen System, z. B. Phagozytose, Mediatorensekretion, Antikörperproduktion usw. Wie schon erwähnt, ist die Zusammensetzung der Immunkomplexe für ihre biologische Bedeutung und Funktion entscheidend.

Die Bindung von Immunkomplexen an Lymphozyten, speziell B-Lymphozyten, hat immunregulatorische Funktionen, deren Charakter in Abhängigkeit von der Komplexzusammensetzung steht. Immunkomplexe, die im Antigenüberschuß gebildet werden, führen zu einer Stimulation der spezifischen Antikörperproduktion aus Plasmazellen, indem sie die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen auslösen (Revoltella, Pediconi, Bertolini und Bosman, 1975), während im Antikörperüberschuß gebildete Komplexe zu einer T-Zell-unabhängigen Suppression der Immunantwort führen (Oberbarnscheidt und Kölsch, 1978). Zurückzuführen ist diese Fähigkeit der Immunkomplexe auf ein doppeltes Erkennungssystem der B-Lymphozyten (Dual recognition), die sowohl Rezeptoren für das Antigen wie auch für Immunglobuline besitzen (Kölsch, Oberbarnscheidt, Brüner und Heuer, 1980). Die Antigenrezeptoren sind klonal restringierte, antigenspezifische Erkennungsstellen, die aus in der Membran verankerten Oberflächenimmunglobulinen bestehen.

Im Falle der Immunsuppression werden die supprimierten B-Zellen zu Gedächtniszellen (Memory-Zellen), deren Funktion in einer schnellen und spezifischen Antwort im Falle eines Zweitkontaktes mit dem Antigen besteht.

Ebenfalls durch Immunkomplexe wird vermutlich die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizitätsreaktion (ADCC) von Lymphozyten über die Bindung an korrespondierende Fc-Rezeptoren (MacLennan, 1972, a,b) supprimiert, jedoch nur, wenn die Komplexe im Antigenüberschuß oder in der Äquivalenzzone gebildet wurden. Im Antikörperüberschuß scheint eher eine Stimulation der zytotoxischen Reaktion stattzufinden (Perlmann, Perlmann und Biberfeld, 1972; Lustig und Bianco, 1976), die im übrigen - wie schon erwähnt - dem Typ II der Allergien zugerechnet werden muß.

Die Eliminierung von Immunkomplexen aus der Zirkulation erfolgt durch Kontakt mit phagozytierenden Zellen, der über Fc- und Komplementrezeptoren vermittelt wird. Auch hier spielen Größe und Zusammensetzung der Komplexe eine entscheidende Rolle (Kijlstra, Daha und v. Es, 1979). Große Komplexe oder

Präzipitate werden sehr schnell entfernt, während kleine Komplexe sich länger in der Zirkulation halten können.

Die beteiligten Zellen sind im wesentlichen mononukleäre Phagozyten, dazu gehören die Kupfferschen Zellen der Leber (Benaceraff, Sebestyen und Cooper, 1959; Arend und Mannik, 1971; Arend und Mannik, 1972; Haakenstad und Mannik, 1974), nur zu einem sehr geringen Teil Granulozyten (Haakenstad und Mannik, 1977). Nach der Aktivierung kann sich die Zahl der verfügbaren Fc-Rezeptoren und Komplement-Rezeptoren auf Makrophagen vergrößern, wodurch auch gleichzeitig die Phagozytosekapazität erhöht ist (Bianco, Griffin und Silverstein, 1975; Rhodes, 1975).

Zusätzlich zu der Komplexeliminierung über Fc-Rezeptoren und Komplementrezeptoren scheint es noch eine andere Möglichkeit zu geben. So konnten verschiedene Autoren zeigen, daß Immunkomplexe auch über eine gewisse Affinität des Antigens an Leberzellen aus der Zirkulation entfernt werden können (Kijlstra, Knutson, Daha und v. Es, 1978; a, b).

Nicht zirkulierende Immunkomplexe, die in extravaskulären Räumen gebildet werden, werden langsamer als zirkulierende Komplexe eliminiert und können deshalb zur Ursache lokal entstehender Entzündungsherde werden (Lambert, 1979).

B. 2.3.3. Die pathophysiologische Bedeutung von Immunkomplex

Die Überempfindlichkeitsreaktionen vom Typ III sind die Folge der Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen im Gewebe, deren Erscheinungsbild in Entzündungsreaktionen besteht. Voraussetzung ist das Auftreten präzipitierender Antikörper der Klasse IgG oder IgM. Ein wesentlicher Faktor ist die Fixierung von Komplement mit allen ihren Folgeerscheinungen. Die anaphylatoxisch und auf Leukozyten chemotaktisch wirkenden Komplementbruchstücke C3a und C5$\overline{67}$ locken Leukozyten an; Thrombozyten werden von Komplexen aggregiert und setzen vaso aktive Amine frei. Durch zunehmende vaskuläre Permeabilität kommt es zur Lokalisation von Immunkomplexen in den Gefäßwänden und einer Infiltration von polymorphkernigen Leukozy-

ten. Die folgende Phagozytose von Immunkomplexen wird begleitet von der Freisetzung lysosomaler Enzyme, die zu Zell- und Gewebeschäden (Läsionen) führen. Die klassischen Formen dieses Krankheitstyps sind die Arthus-Reaktion und die Serumkrankheit.

Bei der Reaktion vom Arthus-Typ (Komplexbildung im Antikörperüberschuß) kommt es zur lokalen Interaktion von Antigen und Antikörper mit den oben beschriebenen Entzüngungserscheinungen. Die Reaktion erreicht ihren Höhepunkt ca. 3 - 8 Stunden nach Antigenapplikation. Klinisch relevante Beispiele sind verschiedene Formen der allergischen Pneumonitis oder "extrinsischen" allergischen Alveolitis, dazu gehört die Farmerlunge, bei der nachgewiesen werden konnte, daß die Betroffenen gegen Actinomyceten sensibilisiert waren.

Der Begriff Serumkrankheit (Komplexbildung im Antigenüberschuß) umfaßt Symptome, die ca. 1 - 3 Wochen nach Injektion von Fremdserum auftreten. In den ersten Jahrzehnten dieses Jahrhunderts, als Patienten noch Pferde-Immunserum gegen Tetanus oder Diphterie injiziert wurde, war sie eine übliche Erscheinung. Ursache der Reaktion ist die Immunantwort des Patienten gegen das fremde Antigen, mit dem die nach einigen Tagen vorhandenen Antikörper Komplexe bilden. Die Ablagerung dieser Komplexe in verschiedenen Geweben erfolgt - anders als bei der Arthus-Reaktion - erst nach ihrer Bildung.

Die Frage der Entfernung von Immunkomplexen aus der Zirkulation führt weiter hinein in den Bereich der klinischen Bedeutung. Theoretische Berechnungen der quantitativen Verhältnisse in einem Modell der akuten Serumkrankheit bei Kaninchen haben gezeigt, daß das mononukleäre Phagozytensystem vermutlich mit Immunkomplexen überladen ist (Wilson und Dixon, 1971). Die nicht gebundenen Immunkomplexe können weiter zirkulieren, sich in Organen ablagern und somit zu pathologischen Erscheinungen führen wie z. B. Glomerulonephritis (Kijlstra, van der Lelij, Knutson, Fleuren und v. Es, 1978), Serum-Hepatitis (Nydegger, Lambert, Gerber und Miescher, 1974; Theofilopoulos, Wilson und Dixon, 1976), infektiöser Endocarditis (Bayer, Theofilopoulos, Eisenberg, Dixon und

Gaze, 1976), rheumatoider Arthritis (Zubler, Nydegger, Perrin, Fehr, McCormick, Lambert und Miescher, 1976) und ulcerativer Colitis (Jewell und McLennan, 1973). Auch bei Tumorerkrankungen (Teshima, Wanebo, Pinsky und Day, 1977) konnten zirkulierende Immunkomplexe nachgewiesen werden.

B. 2.4. Die verzögerte Reaktion (Typ IV)

Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten oder zellvermittelten Typ sind das Ergebnis der Interaktion aktiv sensibilisierter T-Lymphozyten mit dem spezifischen Antigen. Die Vermittlung erfolgt durch eine Reihe von Mediatoren, die auch Lymphokine genannt werden. Diese löslichen Mediatoren sind in der Lage, Entzündungszellen zu rekrutieren, sie zu aktivieren und am Ort der Entzündung festzuhalten.

Der Kontakt der T-Zelle mit dem spezifischen Antigen erfolgt über spezifische Rezeptoren, deren Natur umstritten ist. Als Folge dieses Antigen-Zellkontaktes kommt es zur Proliferation und Differenzierung der T-Zellen zu Effektorzellen mit unterschiedlichen Aufgaben. Da die Zahl der aktivierten Effektorzellen im Entzündungsgebiet meist klein ist, ist die Attraktion von Helferzellen eine wesentliche Funktion der Lymphokine. Nach der Natur ihrer Zielzelle unterteilt man die Mediatoren in

1. Faktoren, die auf Makrophagen wirken:
   a) Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF).
   b) Makrophagen aktivierender Faktor.
   c) Makrophagen (Monozyten) chemotaktischer Faktor.
2. Faktoren, die auf polymorphkernige Leukozyten wirken, wie der Leukozyten-Inhibitionsfaktor (LIF).
3. Chemotaktische Faktoren für Neutrophile, Basophile und Eosinophile.
4. Histamin freisetzender Faktor, der auf Basophile wirkt.

5. Faktoren, die auf nicht sensibilisierte Lymphozyten wirken:

   a) Mitogener Faktor.
   c) Antikörperproduktion stimulierender Faktor.

Durch die Kooperation der verschiedenen Zelltypen miteinander, vor allem von T-Zellen, Makrophagen und Lymphozyten, kann es zu zytotoxischen Reaktionen mit und ohne Beteiligung von Antikörpern kommen. Klinisch bedeutsame Beispiele dieses Typs der Allergie sind die Abstoßung von Hauttransplantaten oder auch der Mantoux-Test (Tuberkulinreaktion).

B. 3. Betrachtungen zur Struktur und Funktion von Fc-Rezeptoren

B. 3.1. Allgemeine Bemerkungen

Rezeptoren auf Zellmembranen, die in der Lage sind, das Fc-Stück eines Antikörpers spezifisch zu binden, werden als Fc-Rezeptoren bezeichnet. Da es eine Reihe spezifischer Antikörperklassen und Subklassen gibt, die zusammen mit den Speziesunterschieden eine große Vielfalt ergeben, ist es sehr wahrscheinlich, daß die Fc-Rezeptoren Proteine sind oder zumindestens einen Proteinanteil haben, da nur Proteine den Anforderungen an Spezifität und Diversität gerecht werden können. Rezeptoren müssen im allgemeinen drei verschiedene Aufgaben erfüllen.

1. Spezifische Erkennung und Interaktion mit dem Liganden, welche eine molekulare Komplementarität voraussetzt. Je geringer diese Komplementarität ist, desto niedriger wird die Affinität der Reaktionspartner zueinander sein.

2. Das externe Signal muß durch die Zellmembran weitergeleitet werden. Das geschieht vermutlich durch Konformationsänderungen - entweder innerhalb eines Rezeptors oder durch Aggregation identischer Membranrezeptoren, deren Wechselwirkung dann zu Konformationsänderungen führt.

3. Die Zelle wird zu einer Antwort auf das externe Signal

veranlaßt. Hierbei eingeschlossen sind Interaktionen mit dem Zytoskelett (Mikrotubuli und Mikrofilamente), Veränderungen des Ionenhaushaltes und Aktivierung von Enzymen, die die sogenannten "second messenger" cAMP und cGMP produzieren, die ihrerseits aktivierende oder regulierende Funktionen übernehmen.

Aufgrund dieser Eigenschaften lassen sich bestimmte theoretische Anforderungen an die Struktur von Rezeptoren stellen. Sie sind wahrscheinlich integrale Membranproteine, da sie das äußere mit dem inneren Milieu verbinden müssen. Zusätzlich ist anzunehmen, daß die Rezeptoren aus Untereinheiten bestehen, die die verschiedenen Funktionen erfüllen können.

B. 3.2. Verbreitung von Fc-Rezeptoren

Der Begriff des Fc-Rezeptors ist von Paraskevas, Lee, Orr und Israels (1972) eingeführt worden. Sie hatten festgestellt, daß durch Papainverdauung erhaltene Fc-Fragmente von Kaninchen-IgG in der Lage waren, sich an Mäuse-Milzzellen zu binden. Hierbei ist das intakte Fc-Stück Voraussetzung für die Bindung (Dickler, 1974; Basten, Warner und Mandel, 1972). Der Begriff des Fc-Rezeptors ist seitdem etabliert und weiter eingeengt worden (Dorrington, 1976).

Fc-Rezeptoren binden sowohl monomeres als auch aggregiertes bzw. durch Antigen komplexiertes Immunglobulin (Sedlacek, 1980), wobei die Bindung monomerer Fc-Stücke bedeutend spezifischer ist. Mit zunehmendem Komplexierungsgrad des Antikörpers steigt die Affinität zum Rezeptor durch multivalente Bindung um ein vielfaches. Gleichzeitig nimmt die Spezifität der Bindung ab. Die Frage, ob die Konformationsänderung der Fc-Stücke innerhalb eines Immunkomplexes der entscheidende Faktor für die erhöhte Affinität ist oder aber die Dichte der Fc-Stücke (Dorrington, 1976), ist noch nicht geklärt.

Die entscheidenden Strukturen für die Bindung des Fc-Teils der Antikörper an Rezeptoren scheinen die sogenannten CH2-

und CH3- Domänen zu sein, distinkte Bereiche mit funktionellen Eigenschaften (Klein, Neauport-Sautes, Ellerson und Fridman, 1977; Alexander, Andrews, Leslie und Wood, 1978), zumindest für Lymphozyten und Makrophagen. Es gibt jedoch auch Befunde, nach denen die "Hinge -Region", das ist das Übergangsstück zwischen Fc-Teil und Fab-Teil, eine Rolle spielt, da es mit $(Fab)_2$-Fragmenten möglich war, eine teilweise Blockade des Fc-Rezeptors zu erreichen (Abramson, Gelfand, Jandel und Rosen, 1970).

Die Funktion der Fc-Rezeptoren steht in engem Zusammenhang mit der Funktion der Antikörper, die sie binden können, und der biologischen Wirksamkeit der Zelle, der sie angehören. Das komplexe System von Antikörperklassen auf der einen und der Vielfalt der im Organismus vorhandenen Zellen auf der anderen Seite macht eine funktionelle und strukturelle Heterogenität der Rezeptorstrukturen sehr wahrscheinlich. In der Tat konnten Fc-Rezeptoren auf Neutrophilen (Messner und Jelinek, 1970), Mastzellen (Tigelaar, Vaz und Ovary, 1971), Makrophagen (Unkeless, 1980; Hay, Torrigiani und Roitt, 1972; Huber, Douglas und Fudenberg, 1969), B-Lympozyten (Yoshida und Anderson, 1972; Basten, Miller und Abraham, 1975), auf Thrombozyten (Henson und Spiegelberg, 1973) und zytotoxischen Killerzellen (Handwerger und Koren, 1976) nachgewiesen werden; daneben in der Plazenta (McNabb, Koh, Dorrington und Painter, 1976) und auch auf Spermien (Sethi und Brandis, 1980).

Weiterhin wurden suklassenspezifische Rezeptoren entdeckt (Unkeless, 1977, 1980), wie in der Maus für IgG2a und IgG2b auf Makrophagen. Diamond, Bloom und Scharff (1978) schlugen als Erklärung vor, daß der IgG2a-Fc-Rezeptor über die CH3-Domäne, der IgG2b-Rezeptor hingegen über die CH2-Domäne binden könnte.

Neben Rezeptoren für monomeres und aggregiertes bzw. komplexiertes IgG (Walker, 1976; Heusser, Anderson und Grey, 1977; Sulica, Gherman, Medesan, Sjöquist und Ghetie, 1979) kann eine Zelle auch verschiedene Rezeptoren für dasselbe

Immunglobulin tragen, wie für das IgE an Rattenmastzellen gezeigt wurde (Froese, 1980; Segal, Sharrow, Jones und Siraganian, 1981). Außer biochemischen Unterschieden weisen diese Rezeptoren Unterschiede in der Affinität zu ihrem Liganden und wahrscheinlich auch in ihrer Funktion auf.

B. 3.3. Struktur

Der allgemeinen Verbreitung und funktionellen Vielfalt der Fc-Rezeptoren steht eine biochemische und strukturelle Variationsbreite gegenüber. Studien für verschiedene Fc-Rezeptoren zeigten Molekulargewichte zwischen 15 000 und 140 000 dalton (Kahn-Perles, Sirè, Boned und Bourgeois, 1980; Conrad und Froese, 1978; Kulczycki, McNearney und Parker, 1976; Rask et al., 1975; Frade et al., 1977; Cooper et al., 1977 Wernet et al., 1975; Premkumar-Reddy et al., 1976; Bourgeois et al., 1977; Molenaar et al., 1977; Loube et al., 1978; Cunningham-Rundles et al., 1978; D'Urso-Coward et al., 1978; Thoenes et al., 1979; Sirè et al., 1980). Die Rezeptoren wurden als Glykoproteine oder auch Lipoproteine mit Phosholipase-Sensitivität beschrieben (Anderson, 1980).

Der Autor hatte durch Solubilisierung mit nicht-ionischem Detergenz (NP 40) Rezeptormaterial aus Mausmakrophagen angereichert, welches in der Lage war, hitzeaggregiertes IgG2b der Maus zu binden. Da der Rezeptor den monomeren Antikörper nicht bindet, kann seine Aktivität gegenüber komplexiertem IgG2b nur durch das gleichzeitige Zusammenwirken vieler Rezeptoreinheiten zustandekommen. Diese Eigenschaft der isolierten Membranpartikel konnte durch Inkubation mit Phospholipase C zerstört werden. Durch Zugabe von Phosphatidyläthanolamin-Liposomen wurde die Aktivität des Rezeptors wiederhergestellt. Der reaktivierte Rezeptor war Trypsin-sensitiv. Der Autor schlug als Erklärung für diese Befunde folgende Möglichkeiten vor:

1. Die univalenten Rezeptoren für IgG2b ($Ka = 7.5 \times 10^6 M^{-1}$) werden durch eine Lipidmatrix in einen multivalenten Komplex überführt, der nun mit sehr viel höherer Affini-

tät seinen Liganden binden kann. Diese Lipidmatrix wird durch Phospholipase C zerstört, was zur Folge hat, daß praktisch keine Ligandenbindung mehr stattfindet.

2. Der Proteinanteil des Rezeptors ist in Abwesenheit des Lipidanteils nicht aktiv. Nach dieser Vorstellung stellt das Lipid eine Art "Cofaktor" für den Rezeptor dar.

Bis heute ist die Frage noch nicht ganz geklärt, ob Fc-Rezeptoren mit anderen Oberflächenkomponenten der Zellmembran assoziiert sind oder nicht. Es gibt Hinweise, die auf eine enge Nachbarschaft zwischen $ß_2$-Mikroglobulin, HLA- und Ia-Antigenen und Fc-Rezeptoren (Sarmay, Sanderson und Ivanyi, 1979; Solheim, Thorsby und Möller, 1976; Stout, Murphy, McDevitt und Herzenberg, 1977) schließen lasen. Diese Ergebnisse wurden durch Inhibitionsversuche erzielt, bei denen die Interaktion von Fc-Rezeptor und Ligand durch Antiseren gegen $ß_2$-Mikroglobulin, HLA- oder Ia-Antigene blockiert werden konnten. Die Möglichkeit einer sterischen Hemmung durch das Fc-Stück des Antikörpers konnte von den Autoren jedoch nicht ausgeschlossen werden.

B . 3.4. Funktionen

Die Funktionen der Fc-Rezeptoren sind mannigfaltig, in Abhängigkeit von der beteiligten Zelle und der Klasse der Antikörper. Durch die Bindung ihres Liganden vermitteln sie so grundlegende immunologische Prozesse wie Phagozytose durch Makrophagen oder Granulozyten oder Exozytose lysosomaler Enzyme aus neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Sie sind ebenfalls verantwortlich für die Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität, für den Katabolismus von Immunglobulinen und für die Immunregulation, vor allem der Antikörperantwort. Des weiteren scheint der plazentale Transfer von IgG ebenfalls über die Vermittlung von Fc-Rezeptoren zu laufen.

Einige ihrer Funktionen können die Fc-Rezeptoren nur in Zusammenarbeit mit anderen Rezeptoren, insbesondere Antigen-

und Komplementrezeptoren, erfüllen, beispielsweise die Regulation der Antikörperproduktion durch einen "feedback"-Mechanismus, bei der die gleichzeitige Bindung von Antigen und Antikörper in Form von Immunkomplexen an B-Zellen von entscheidender Bedeutung ist. In diesem Fall wird die Spezifität der B-Zell-Reaktion vom Antigen bestimmt, welches entscheidet, ob Proliferation und Differenzierung zur Plasmazelle oder zur "Gedächtniszelle" stattfindet. Den auslösenden Reiz für diese Reaktion gibt jedoch der Antikörper über seinen Kontakt zum Fc-Rezeptor. Hier wird klar, daß durch das Zusammenwirken verschiedener Systeme ein hohes Maß an Spezifität und Diversität erreicht werden kann.

Nach den bisherigen Schilderungen ist die Rolle der Fc-Rezeptoren bei allergischen Antworten klar zu umfassen: bei allen Formen der Überempfindlichkeit sind sie ein zentraler Reaktionspartner. Sie sind in der Lage, über die Bindung von IgE und Antigen an Mastzellen und basophile Leukozyten zur Ausschüttung von Mediatoren zu führen, vermitteln die Aktivierung anderer Zielzellen wie Thrombozyten, Granulozyten, Makrophagen, zytotoxischen Killerzellen usw. über die Bindung löslicher Immunkomplexe bzw. opsonisierter Antigene wie Blutzellen, Bakterien, Viren usw.

Die Rolle der Fc-Rezeptoren auf Mastzellen und Basophilen im Zusammenhang mit der Überempfindlichkeitsreaktion vom Sofort-typ soll im nächsten Abschnitt ausführlicher behandelt werden.

B. 4. IgE-Rezeptor und Anaphylaxie

Der Typ I der Überempfindlichkeit, die anaphylaktische Reaktion, wird vermittelt durch das Immunglobulin E (IgE) (Ishiza 1976; Ishizaka und Ishizaka, 1978). Man weiß seit längerer Zeit, daß Mastzellen und basophile Leukozyten Rezeptoren auf der Zelloberfläche tragen, die in der Lage sind, das IgE mit hoher Affinität zu binden (Ishizaka und Ishizaka, 1975; Metzger, 1977). Die Bindung des Antikörpers erfolgt über seinen Fc-Teil (König und Ishizaka, 1976; Ishizaka, Ishizaka

und Lee, 1970; Dorrington und Bennich, 1978), während der antigenbindende Teil zunächst frei bleibt. Diese Eigenschaft des IgE, sich mit Hilfe seines Fc-Stücks an spezielle Rezeptoren auf Mastzellen oder basophile Leukozyten zu binden, bezeichnet man auch als zytotrop.

B. 4.1. Struktur des IgE

Obwohl das IgE im Serum nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorkommt - 0.1 - 0.7 ng/ml beim Menschen (König, Henn und Stockinger, 1978) - so ist doch bekannt, daß es eine herausragende Rolle bei allergischen und parasitischen Erkrankungen spielt. Nach seiner Entdeckung im Jahre 1966 (Ishizaka, Ishizaka und Hornbrook,1966) erlaubte aber erst das spätere Auftreten zweier Myelom-IgE Fälle, ND und PS (Johansson und Bennich, 1967; Ogawa, Kochwa, Smith, Ishizaka und Mc Intyre, 1969), eine genaue strukturelle Analyse, da es nun in ausreichend großen Mengen verfügbar war.

Das IgE hat ein Molekulargewicht von 190 000 dalton und eine Sedimentationskonstante von 7.29 S. Es ist ein Protein mit 12 % Kohlehydratanteil und besteht wie IgG aus zwei leichten und zwei schweren Ketten (ε-Ketten); die letzteren bestimmen die Klassenzugehörigkeit des IgE und seine biologischen Eigenschaften.

Aus Sequenzierungsdaten weiß man, daß die Struktur des IgE analog der des IgG ist; der wesentliche Unterschied besteht aber darin, daß es auf der schweren Kette eine zusätzliche Domäne, die C 4-Domäne, besitzt (IgG besitzt nur drei Domänen). Nach Untersuchungen von Dorrington und Bennich (1973) sind die C 4- und die C 3-Domäne an der Rezeptorbindung des Fc-Stücks beteiligt. Wie schon beschrieben, sind die entsprechenden Regionen des IgG C 3 und C 2 (CH2 und CH3). Durch milde alkalische Reduktion verliert das IgE seine zytotropen Eigenschaften. Da hierdurch Disulfid-Brücken innerhalb der CH1-Domäne und zwischen den CH2-Domänen zerstört werden (Takatsu, Ishizaka und Ishizaka, 1975), scheinen diese Regionen wichtig für die Affinität der CH3- und CH4-Domänen zum IgE-Rezeptor zu sein.

B. 4.2. Aktivierung von Mastzellen und Basophilen

Nach der Entdeckung von Ratten-Myelom-IgE (Bazin, Querinjean, Beckers, Heremans und Dossy, 1974) war man in der Lage, genaue Bindungsstudien im Tiermodell durchzuführen. Wie schon erwähnt, bindet sich das IgE mit außerordentlich hoher Affinität an seinen Rezeptor (König und Ishizaka, 1974; König, Okudeira und Ishizaka, 1974; König, 1977). Bindet sich nun das korrespondierende Antigen an das Fab-Ende, so kommt es zur Aktivierung der Zelle und zur Ausschüttung der Entzündungsmediatoren der Typ I-Reaktion (König, 1979). Das für die Aktivierung der Zellen notwendige Signal scheint die Aggregation zweier Rezeptoren durch die verknüpfende Antigenbindung zu sein (Segal, Taurog und Metzger, 1977; Fewtrell und Metzger, 1980), wobei die Rolle des IgE eher als eine passive angesehen wird (Ishizaka, Ishizaka, Conrad und Froese, 1978).

Es gibt eine Reihe anderer Substanzen, die neben dem Antigen die Aggregation der Rezeptoren mit nachfolgender Histaminsekretion ebenfalls herbeiführen können. Einige erzielen ihre Wirkung ebenfalls über das zellgebundene IgE, wie beispielsweise anti-IgE Antiseren, die - genau wie das Antigen auch - die Zelle aktivieren können (Taurog, Mendoza, Hook, Siraganian und Metzger, 1977). Es scheint dabei nicht wichtig zu sein, an welcher Stelle des IgE-Moleküls die Vernetzung stattfindet, da man die Zellaktivierung auch mit Concanavalin A erreichen kann (Keller, 1973), das über bestimmte Zuckerreste in der Fc-Region zur Aggregation führt (Magro, 1974). Die Existenz von Aktivierungsmodellen, an denen das IgE-Molekül nicht beteiligt ist, legte den Schluß nahe, daß die Aggregation der Rezeptoren die entscheidende Rolle spielt. So konnten Ishizaka und Ishizaka (1978) sowie Isersky, Taurog, Poy und Metzger (1978) zeigen, daß bivalente Antikörper gegen den IgE-Rezeptor zur Stimulation ausreichen.

Nach einer anderen Vorstellung besitzt das zytotrope Antikörpermolekül sowohl eine Bindungsstelle für den Fc-Rezeptor als auch eine Aktivierungsregion, die nach der Antigen-

vernetzung die Zelle stimuliert (Stanworth, King, Roy, Moran und Moran, 1979; Jasani und Stanworth, 1973).

Die biochemischen Prozesse, die der Aggregation der IgE-Rezeptoren folgen und schließlich zur Mediatorensekretion führen, sind in wesentlichen Punkten aufgeklärt (König, Pfeiffer, Szperalski und Bohn, 1981). Abb. 1 faßt die heute bekannten Fakten zusammen.

Nach dieser Vorstellung führt die Verknüpfung zweier IgE-Rezeptoren zur Aktivierung einer membranständigen Adenylzyklase und eines weiteren, proteolytischen Enzyms, welches entweder ein Teil des IgE-Rezeptors selbst oder ihm zumindest assoziiert ist. Dieses Enzym stimuliert seinerseits die Methylierung von Phosphatidylaethanolamin durch eine Methyltransferase I. Eine Methyltransferase II methyliert das gebildete Phosphatidylmonomethylaethanolamin zu Phosphatidylcholin, welches Kanäle in der Membran für den Einstrom von Calcium-Ionen öffnet. Die Aktivierung des Lipidstoffwechsels führt zur Arachidonsäure, deren Umbau durch Lipoxygenase oder durch Cyclooxygenase zur Mediatorensekretion bzw. Prostaglandinsynthese führt. Die oben genannten Autoren konnten zeigen, daß die Lipoxygenaseprodukte nicht nur Entzündungsmediatoren sind, sondern auch Modulatoren der IgE-vermittelten Sekretion. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß einige Autoren (Suzuki, Sadasivan, Saito-Taki, Stechschulte, Balentine und Helmkamp, 1980) dem Fc-γ-Rezeptor auf B-Lymphozyten Phospholipase A_2-Aktivität zuordnen konnten.

B. 4.3. Allergische Reaktionsbereitschaft und Desensibilisierung

Es ist seit vielen Jahren bekannt, daß der Vernetzungsgrad zellgebundener IgE-Moleküle, der für die Histaminsekretion erforderlich ist, nicht sehr hoch ist (Fewtrell und Metzger, 1980). Levine (1965) und Segal, Taurog und Metzger (1977) schlugen vor, die Aggregation von 2 Rezeptoren als das auslösende Signal zu betrachten.

In Übereinstimmung mit dieser Theorie stellte man fest, daß die Zahl der gebundenen IgE-Moleküle pro Zelle nicht entschei-

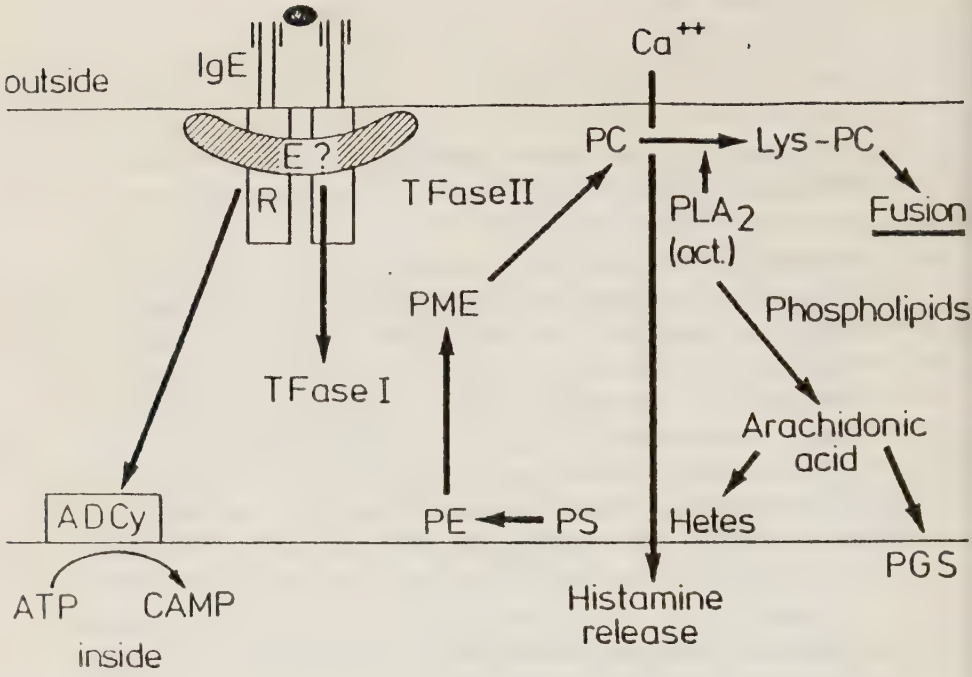

Abb. 1: Biochemische Prozesse in der Membran nach der Verknüpfung von zwei IgE-Molekülen durch Antigen.
E = Enzym; T Fase = Methyltransferase; PS = Phosphatidylseri
PE = Phosphatidylaethanolamin; PME = Phosphatidylmono-methylaethanolamin; PC = Phosphatidylcholine;
PL A_2 = Phospholipase A_2; Hetes = Hydroxy-eicosatetraen-säure; PGS = Prostaglandine (nach König, Pfeiffer, Szperalsk und Bohn, 1981).

dend ist für die allergische Reaktionsbereitschaft, d. h. das Ausmaß der Mediatorensekretion. Zellgebundenes IgE dissoziiert unter sauren pH-Bedingungen (pH 4) sehr schnell von der Zelle ab (Ishizaka und Ishizaka, 1974). Conroy, Adkinson und Lichtenstein (1977) konnten mit Hilfe der sauren IgE-Elution die Zahl der IgE-Moleküle pro basophiler Zelle bei verschiedenen Individuen auf 4000 - 500 000 beziffern und stellten fest, daß diese Zahl in Korrelation mit dem Serum-IgE-Spiegel steht. Beeindruckend war, daß die Sensitivität der Zellen (Histaminfreisetzung mit anti-IgE) nicht mit ihrem IgE-Besatz korrelierte. Wichtig für den Aktivierungsgrad war allerdings ein optimales Verhältnis von IgE- zu anti-IgE-Molekülen.

Es gibt eine Reihe von Faktoren, die die Histaminausschüttung kontrollieren. So ist z. B. in unserem Labor ein Protein im Serum von Ratten beschrieben worden, das in der Lage ist, eine passiv-kutane Anaphylaxiereaktion (PCA) in der Ratte zu blockieren (König und Henn, 1979; Theobald und König, 1981) oder - je nach Konzentration - zu verstärken. Dieser Faktor hat ein Molekulargewicht von 65 000 - 70 000 dalton und einen isoelektrischen Punkt bei pH 5.4. Im Serum allergischer Ratten ist seine Aktivität 40 mal so hoch wie im Serum normaler Ratten.

Der Sekretionsprozeß von Mastzellen und basophilen Leukozyten besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Schritten: 1. der Ausschüttung histaminhaltiger Granulen und 2. der Desensibilisierung. Darunter versteht man einen Zustand, in dem die Zelle unfähig ist, auf einen erneuten Stimulus durch das spezifische Antigen (spezifische Desensibilisierung) oder auf beliebige andere Stimuli zu reagieren (unspezifische Desensibilisierung). Calcium-Ionen, eine notwendige Voraussetzung für die Aktivierung der Zelle, sind bei der Desensibilisierung nicht nötig bzw. sogar störend.

Sobotka, Dembo, Goldstein und Lichtenstein (1979) postulierten ein Enzym, das IgE-Moleküle, die durch ein Antigen vernetzt wurden, abbaut. Bei diesem Prozeß würden ausschließlich antigenspezifische IgE-Moleküle zerstört.

Unspezifische Desensibilisierung ist z. B. durch Vernetzung der IgE-Moleküle auf der Zelloberfläche mit anti-IgE zu erreichen oder durch Antigengabe in Abwesenheit von Calcium. Wichtig ist auch die Konzentration des Antigens (König, Pfeiffer, Szperalski und Bohn, 1981): liegt sie unter der für die Aktivierung der Zelle notwendigen Dosis oder sehr weit darüber (Antigenexzess), findet keine Aktivierung der Zelle, sondern Desensibilisierung statt. Ob diese Vorgänge auf eine Veränderung des IgE-Moleküls oder des IgE-Rezeptorkomplexes zurückzuführen sind, ist noch nicht geklärt.

B . 4.4. Struktur des IgE-Rezeptors

Ratten-Mastzellen und RBL-Zellen tragen auf ihrer Zelloberfläche Rezeptoren für IgE. Sie können Ratten- und Mäuse-IgE binden, aber kein menschliches IgE (Kulczycki, Isersky und Metzger, 1974).

Zur Reinigung der Fc-ε-Rezeptoren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Versuche unternommen. Die prinzipielle Methodik war wie folgt: Mastzellen wurden mit nicht-ionischem Detergenz solubilisiert (1 % NP40) und die Rezeptorpartikel mit IgE und anti-IgE präzipitiert. Entweder die Zellmembran oder das IgE-Molekül war hierbei mit ^{125}J oder ^{131}J markiert. Die Untersuchungen der so gewonnenen Fraktionen erfolgte durch Gelfiltration (König, 1977) oder durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Conrad und Froese, 1976; Kulczycki, McNearney und Parker, 1976). Bei einer anderen Reinigungsmethode (Conrad und Froese, 1978; Kulzycki, Hempstead, Hofmann, Wood und Parker, 1979) wurde IgE-Sepharose zur Anreicherung des Rezeptors benutzt. Das angereinigte Produkt wurde anschließend durch Gelfiltration oder SDS-PAGE untersucht.

Mit Hilfe der SDS-PAGE wurde der IgE-Rezeptor als ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 50 000 dalton charakterisiert (Conrad und Froese, 1978; Kulczycki, McNearney und Parker, 1976). Bei Untersuchungen durch Gelfiltration konnte neben einer leichteren (ca. 40 000 dalton) vor allem schwerere Komponenten gezeigt werden, deren Molekulargewicht zwi-

schen 100 000 und 300 000 bzw. bei 170 000 dalton lag (König, 1977; Kulczycki, Hempstead, Hofmann, Wood und Parker, 1979). Diese Präparation bestand vermutlich aus Rezeptoraggregaten und enthielt noch unbekannte Mengen an Detergenz. In beiden Fällen konnte gezeigt werden, daß die gewonnenen schweren Komponenten biologisch noch aktiv waren, d. h. IgE binden konnten.

Die Untersuchungen des monomeren Rezeptors wurden lange Zeit dadurch behindert, daß das angereinigte Rezeptormaterial biologisch nicht mehr - oder kaum - aktiv war (Conrad und Froese, 1978; Rossi, Newman und Metzger, 1977). Erst Kulczycki und Parker (1979) konnten über Adsorption an IgE-Sepharose größere Mengen biologisch aktiven Rezeptors reinigen. Die Elution von der Sepharose erfolgte in der Kälte (4°C) mit 0.5 N Essigsäure (+ 1 % NP40). Das Eluat wurde sofort neutralisiert. Dieses aktive Material zeigte in der SDS-PAGE eine einzige Bande mit einem Molekulargewicht von 50 000 dalton.

Ein aus humanen basophilen Leukozyten mittels Adsorption an IgE-Sepharose isolierter Fc-ε-Rezeptor hat nach Schätzungen von Hempstead, Parker und Kulczycki (1979) ein Molekulargewicht von 58 000 dalton.

Während der IgE-Rezeptor traditionell als ein Transmembranprotein angesehen wird, sprechen neue Befunde von Goetze, Kanellopoulos und Metzger (1981) für einen Aufbau des Rezeptors aus mehreren Untereinheiten. Er besteht aus zwei nicht kovalent gebundenen Polypeptidketten: α (55 000 dalton) und ß(35 000 dalton). Durch Lactoperoxidase-Oberflächenmarkierung der Zellmembran mit ^{125}J ist nur der α-Teil zu erfassen. Er enthält auch die Zuckerreste, wie durch Behandlung mit einer Sa c charidase gezeigt werden konnte. Durch Verdauung mit verschiedenen Proteasen entstehen ein 30 000 und ein 34 000 dalton-Fragment.

In neuerer Zeit gibt es Befunde dafür, daß Ratten-Mastzellen zwei IgE-Rezeptoren tragen, den bereits beschriebenen mit hoher Affinität zum Liganden und einen mit niedriger Affinität für IgE (Froese 1980; Segal, Sharrow, Jones und Siraganian, 1981; Kepron, Conrad und Froese, 1981). Rezeptoren für IgE

wurden auch auf anderen Zellen nachgewiesen. Meinke, Magro, Lawrence und Spiegelberg (1978) beschrieben auf Lymphozyten Rezeptoren mit niedriger Affinität (im Vergleich zur Mastzelle), ebenso Fritsche und Spiegelberg (1978). Capron, Dessaint, Joseph, Rosseaux, Capron und Bazin (1977) sowie Dessaint, Capron, Joseph und Bazin (1979) zeigten Rezeptoren für komplexiertes IgE auf Rattenmakrophagen.

B. 5. Die Rolle von Fc-γ-Rezeptoren bei der Typ I Reaktion

Seit langem ist bekannt, daß es in der Ratte noch einen anderen zytotropen Antikörper gibt, das IgGa (Morsett, Bloch und Austen, 1968). Frühe Untersuchungen zeigten, daß sich IgGa ebenso wie IgE an Mastzellen bindet und zur Freisetzung von Mediatoren führt (Bach, Bloch und Austen, 1971 a, b). Versuche, die Bindung von IgGa an Mastzellen im direkten Bindungsassay nachzuweisen, waren jedoch nicht erfolgreich (König und Ishizaka, 1976); es wurden weniger als 1 % der angebotenen Radioaktivität im ^{125}J-Bindungsassay gebunden. Somit blieb es unklar, auf welchem Wege der Antikörper eine PCA-Reaktion auslöste. Eine Erklärungsmöglichkeit dieser widersprüchlichen Befunde ist die Annahme einer sehr niedrigen Affinität des monomeren Antikörpers zu seiner Bindungsstelle.

Halper und Metzger (1976) postulierten kompetitive Wechselwirkungen zwischen IgGa-Immunkomplexen und IgE bezüglich der Bindung. Sie konnten die Bindung von IgE an RBL-Zellen durch Vorinkubation der Zellen mit IgGa-Immunkomplexen bis zu 60 % inhibieren und schlossen daraus auf Identität der Fc-ε- und Fc-γ-Rezeptoren. Da sie allerdings nicht mit löslichen Immunkomplexen, sondern mit Präzipitaten arbeiteten, konnten sie eine rein sterische Hinderung der IgE-Bindung nicht ausschließen. Weiterhin zeigten die Autoren, daß die Bindung von IgE an isolierte Membranpartikel, deren IgE-Rezeptorzahl sie mit 25 - 50 angaben (pro Partikel), durch IgGa-Immunkomplexe nicht inhibiert werden konnte. Da die Bindung des IgGa an seine Rezeptoren nur durch sogenanntes "multipoint attachment", d. h. durch die gleichzeitige Bindung vieler Fc-Stücke möglich ist, war die Rezeptorenzahl dieser kleinen Membranpartikel zu niedrig.

Während im Rattenmodell die Frage des Fc-γ-Rezeptors weiterhin ungeklärt blieb, konnten Daeron und Voisin (1979) in der Maus zeigen, daß Fc-ε- und Fc-γ-Rezeptor auf Mastzellen vorkommen. Sie beschrieben die Degranulation von Mastzellen durch IgG1-Antikörper, die in der Lage waren, mit ihrem Fab-Teil Histokompatibilitätsantigene auf der Zelloberfläche zu erkennen und gleichzeitig mit dem Fc-Stück an den Fc-γ-Rezeptor zu binden. Ferner konnten sie zeigen, daß beide Rezeptoren nebeneinander auf einer Zelle vorkommen und funktionell voneinander unabhängig sind (Daeron, Prouvost-Danon und Voisin, 1980).

Ähnliche Experimente in der Ratte führten zu entgegengesetzten Ergebnissen (Mossmann, Schmitz, Lauer, Staffer, Gehrung, Günther und Hammer, 1979; Mossmann, Lauer, Vortisch, Günther, Bazin und Hammer, 1976). Alloantikörper gegen Histokompatibilitätsantigene veranlassten Mastzellen zur Histaminausschüttung und inhibierten die Bindung von IgE. Die IgG-Antikörper wurden also entweder mit ihrem Fc-Teil gleichzeitig an den IgE-Rezeptor oder aber zumindest an eine ihm assoziierte Stelle gebunden. Im Rattenmodell fehlte somit immer noch eine exakte Bindungsanalyse.

Das Problem der "in vitro"-Untersuchung zur Bindung des IgGa ist, wie beschrieben, wahrscheinlich die geringe Affinität des Antikörpers, genauer seines Fc-Stücks, zum Rezeptor. Nun käme man der "in vivo"-Situation wohl näher, würde man den Antikörper mit Hilfe eines Antigens in einen Immunkomplex überführen, dessen Affinität zum Fc-Rezeptor um ein vielfaches höher wäre aufgrund seiner multivalenten Bindung (Roitt, 1972). Knutson, Kijlstra und van Es (1977) konnten dies für aggregiertes IgG an Makrophagen zeigen.

B. 6. Problemstellung

1. Vor dem Hintergrund der immunologischen und klinischen Bedeutung von Immunkomplexen im Verlauf der Überempfindlichkeitsreaktionen, sollte in dieser Arbeit versucht werden, die Rolle des IgGa der Ratte während der anaphylaktischen Reaktion zu analysieren.

Hierbei bestand ein wesentlicher Teil der angewandten Methodik darin, Hitzeaggregate bzw. Immunkomplexe des Antikörpers definierter Größe zu isolieren, mit deren Hilfe exakte Bindungsstudien der Liganden-Rezeptorinteraktion durchgeführt wurden. Zielzellen dieser Studien waren neben Rattenmastzellen vor allem Ratten-basophile Leukämiezellen (RBL), eine Tumorzellinie, die in unserem Labor kultiviert wird. Es ist bekannt, daß diese Zellen Rezeptoren für IgE tragen (Kulczycki, Isersky und Metzger, 1974).

Ein großer Teil der Versuche wurde ausschließlich mit Hitzeaggregaten durchgeführt, Dies erscheint durchaus gerechtfertigt, da die biologischen Eigenschaften der aggregierten Antikörper durch die Hitzebehandlung nicht zerstört werden. Hitzeaggregiertes IgG kann Komplement fixieren (Christian, 1960), eine Arthus-Reaktion induzieren (Ishizak 1963) und wird wie Immunkomplexe aus der Zirkulation entfernt (Brown, Harris, Papamichail, Sljivic und Holborow, 1973; Mauer, Fisch, Blau und Michael, 1972). Außerdem kann es kompetitiv in Untersuchungen zum Nachweis löslicher Immunkomplexe wirken (Cowdery, Treadwell und Fritz, 1975).

Obwohl Hitzeaggregate offensichtlich ein einfaches und praktisches Modell für Immunkomplexe darstellten, wurden einige Versuche mit Immunkomplexen wiederholt.

Untersucht wurden der Einfluß von Zeit, Temperatur, pH, Calcium-Konzentration des Mediums und der Größe der Aggregate auf das Bindungsverhalten. Außerdem wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt und Kompetitionsexperimente sowohl mit IgGa als auch mit IgE durchgeführt.

2. Nach Abschluß der Bindungsstudien erhob sich die Frage nach der biologischen Bedeutung von IgGa-Immunkomplexen. Als Parameter für diese Experimente wurden die Sekretion von Histamin aus Rattenmastzellen und der Einstrom von Calcium-Ionen, der der Mediatorensekretion unmittelbar vorausgeht (Foreman, Hallett und Mongar, 1977), gewählt.

Neben der Wirkung des IgGa allein ist natürlich wichtig,

ob IgGa in der Lage ist, den durch IgE vermittelten Calcium-Einstrom bzw. die Histaminsekretion zu modulieren. Für diese Versuche wurde ein Sekretionsmodell benutzt, welches aus aktiv mit IgE sensibilisierten Mastzellen und einem gegen diesen Antikörper gerichteten Antiserum bestand, das durch Verknüpfung der IgE-Moleküle zur Aktivierung der Zellen führt. Die Sensibilisierung der Mastzellen wurde durch Infektion der Ratten mit dem Nematoden Nippostrongylus brasiliensis erreicht, von dem bekannt ist, daß er im befallenen Tier eine hohe IgE-Antikörperproduktion auslöst (Ishizaka, König, Kurata, Mauser und Ishizaka, 1975). Die zirkulierenden Antikörper bewirken einen hohen Sättigungsgrad der IgE-Rezeptoren auf Mastzellen bzw. basophilen Leukozyten.

3. Im letzten Teil der Arbeit sollte versucht werden, den Fc-γ-Rezeptor zu reinigen und sein Molekulargewicht zu bestimmen. Neben der üblichen Methode der Präzipitation von Ligand-Rezeptorkomplexen nach Solubilisierung der Zellen wurden außerdem monoklonale Antikörper gegen Rattenmastzellen aus der Maus hergestellt. Sie wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, den Fc-γ-Rezeptor zu erkennen und zu blockieren. Die positiven Antikörper wurden zur weiteren Charakterisierung des Rezeptors verwendet.

C. Material und Methoden

C.I. Material

C.I.1. Puffer und Lösungen

C.I.1.1. Physiologische Puffer

Borate-Buffered-Saline, pH 8.0 (BBS)

NaCl	0.15 M
H_3BO_4	0.01 M

ad 1 l Aqua dest.

Hanks` Balanced Salt Solution, pH 7.4 (HBSS)

$CaCl_2$	1 mM
Glucose	8 mM
KCl	5.36 mM
KH_2PO_4	0.44 mM
$MgSO_4$	0.4 mM
NaCl	136.9 mM
Na_2HPO_4	0.27 mM
Phenolrot	0.028 mM
HEPES	15 mM

ad 1l Aqua dest.

Diesem Puffer können noch 0.5 % BSA zugesetzt werden (HBSS-BSA).

Phosphate Buffered Saline n. Dulbecco, pH 7.2 (PBS)

$CaCl_2$	0.68 mM
$MgSO_4$	0.49 mM
KCl	2.68 mM
KH_2PO_4	1.47 mM
NaCl	136.9 mM
Na_2HPO_4	6.46 mM

ad 1l Aqua dest.

Phosphate Buffered Saline, pH 7.2 (PBS)

NaCl	616	mM
Na_2HPO_4	41.58	mM
KH_2PO_4	15.8	mM

ad 5l Aqua dest.

Tris-Calcium-Magnesium-Puffer, pH 7.4 (TCM)

Tris	25	mM
$CaCl_2$	0.6	mM
$MgCl_2$	1.0	mM

ad 1l Aqua dest.

Dieser Puffer kann durch HSA (0.3 g/l) ergänzt werden (TACM).

Tris-EDTA-Puffer, pH 7.4 (TEDTA)

Tris	25	mM
EDTA	10	mM
Natriumazid	10	mM

ad 1l Aqua dest.

Tyrode-Puffer, pH 7.4

NaCl	137	mM
KCl	2.7	mM
NaH_2PO_4	0.4	mM
$NaHCO_3$	12	mM
Glucose	5.6	mM
$MgCl_2$	1.0	mM
$CaCl_2$	1.0	mM
HEPES	15.0	mM

ad 1l Aqua dest.

Veronalpuffer, pH 7.3

NaCl	145 mM
$CaCl_2$	0.15 mM
$MgSO_4$	0.6 mM
Diäthylbarbitursäure	3.1 mM
Na-Diäthylbarbiturat	1.8 mM

C.I.1.2. Puffer für die SDS-PAGE

Probenpuffer

3 % SDS, 5 % Mercaptoäthanol, 10 % Glycerin, 0.0075 % Bromphenolblau und 0.3 mg/ml PMSF in 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8.

Elektroden-Laufpuffer

0.1 % SDS in 0.025 M Tris und 0.2 M Glycin, pH 8.8

Trenngel

7.5 % bzw. 10 % Acrylamid, 0.1 % SDS, 0.05 % TEMED und 0.05 % Ammoniumpersulfat in 0.375 M Tris-HCl-Puffer, pH 8.0

Sammelgel

4.5 % Acrylamid, 0.1 % SDS, 0.1 % TEMED und 0.01 % Ammoniumpersulfat in 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8

Färbebad

0.1 % Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva, Heidelberg) in 50 % TCA.

Entfärber

10 % Eisessig / 10 % Isopropanol

C.I.1.3. Puffer für den elektrophoretischen Proteintransfer (Western-Blot)

Transfer-Puffer

Glycin	0.2 M
Tris	0.025 M
Methanol	20 %
$MgCl_2$	0.01 M
SDS	0.1 %

Färbelösung

Amidoschwarz	0.1 %
Methanol	45 %
Essigsäure	2 %

Entfärber

Methanol	90 %
Essigsäure	2 %

Beschichtungspuffer, pH 7.4

BSA	3 %
NaCl	0.9 %
Tris	10 mM

Waschpuffer, pH 7.4

NaCl	0.9 %
Tris	10 mM

C.I.1.4. Puffer für den direkten immunologischen Nachweis des Rezeptors im SDS-Polyacrylamidgel

Fixierbad

Methanol	46 %
Essigsäure	8 %
Aqua dest.	46 %

Puffer A, pH 7.4

NaCl	0.15 M
Tris-HCl	0.05 M
Na-Azid	0.1 %

C.I.1.5. Puffer für den ELISA

Beschichtungspuffer

0.2 M Na-Carbonat-/Bicarbonatpuffer, pH 9.3-9.5

Inkubationspuffer, pH 7.2

Na-Phosphatpuffer	50 mM
NaCl	0.1 M
Albumin	1.0 %
Tween 20	0.05 %
Na-Azid	0.02 %

Waschpuffer

NaCl	0.15 M
Tween 20	0.05 %
Na-Azid	0.02 %

Substratpuffer, pH 9.8

Diaethanolamin
Merck-Schuchardt, Darmstadt 9.6 %
$MgCl_2$ 0.3 mM
Dem Substratpuffer wird vor Gebrauch 1.69 mg/ml p-Nitrophenylphosphat-dinatriumsalz (Merck, Darmstadt) zugesetzt.

C.I.1.6. Puffer für die Immunpräzipitation

NET-Puffer, pH 7.4

NaCl	0.15 M
EDTA	5 mM
Tris	50 mM

C.I.1.7. Reagenzien für die Immunelektrophorese und Agardiffusionstests

Agarose

Agarose	1 %
EDTA	0.005 M
Na-Azid	0.01 %

Die Reagenzien werden in Elektrodenpuffer (Merck, Darmstadt), pH 8.6, aufgelöst.

Färbelösung

Coomassie Blue R 250 (Serva Heidelberg)	1.25 g
Essigsäure	46 ml
Methanol	22.7 ml

ad 500 ml Aqua dest.
Nach der Auflösung des Farbstoffs wird die Lösung filtriert, um feste Partikel zu entfernen.

Entfärber

Essigsäure	7.5 %
Methanol	5.0 %

C.I.1.8. Reagenzien zur Proteinbestimmung n. Lowry

Lösung A1

2 g Natriumtartrat ad 100 ml Aqua dest.

Lösung A2

1 g $CuSO_4$ ad 100 ml Aqua dest.

Lösung A3

20 g Natriumcarbonat ad 1l 0.1 N NaOH

Reagenz A

0.5 ml Lösung A1
0.5 ml Lösung A2
50 ml Lösung A3

SDS-Reagenz

1 ml 20 % SDS
5.3 ml 0.75 M Na_2CO_3
2.7 ml Aqua dest.

Reagenz A und das SDS-Reagenz werden vor jeder Proteinbestimmung frisch angesetzt.

C.I.2. Medien zur Zellzüchtung

RPMI 1640

Dieses Medium wurde zur Anzucht von RBL-Zellen verwendet. Es enthielt als Zusätze 10 % FCS, 2 mM Glutamin und 100 IU Penicillin/Streptomycin. Sämtliche Reagenzien stammten von der Firma Flow Laboratories, Bonn.

DMEM

Tumorzellen und Hybridomzellen wurden in DMEM mit folgenden Zusätzen kultiviert/ Glutamin (2 mM), Pyruvat (1 mM), Streptomycin (100 µg/ml), Penicillin (100 IU/ml), Amphotericin B (2.5 µg/ml), Kanamycin (4 µg/ml), Neomycin (4 µg/ml), hitzeinaktiviertes Pferdeserum (15 %) und 3.7 g $NaHCO_3$/l. DMEM (4.5 g Glucose/l) und sämtliche Zusätze wurden von Gibco, Karlsruhe, bezogen.

HAT-Medium

Das hier verwendete HAT-Medium hatte folgende Zusammensetzung: 10^{-4} M Hypoxanthine, 4 x 10^{-7} M Aminopterin und 1.6 x 10^{-5} M Thymidin in DMEM mit allen Zusätzen.

Einfriermedium

Zum Einfrieren der Zellen wurde je nach Zelltyp RPMI 1640 bzw. DMEM mit erhöhtem FCS bzw. Pferdeserumgehalt (25 %) und DMSO (12 %) verwendet.

C.II. Methoden

C.II.1. Immunglobuline der Ratte

IgGa

Ratten-IgGa wurde nach der Methode von Ishizaka, König, Kurata, Mayer und Ishizaka (1975) gewonnen. Normales Rattenserum wurde mit Ammoniumsulfat (50 %) präzipitiert und das Präzipitat anschließend abgeschleudert (30 min, 17.000 g), in BBS mit Ammoniumsulfat (50 %) gewaschen, in NaCl resuspendiert (0.9 %) und dann 18 St. gegen Phosphatpuffer (0.005 M, pH 8.0) dialysiert. Das Protein wurde auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte DEAE-Säule gegeben (7 x 30 cm, Whatman, Springfield Mill, Maidstone, Kent.) und chromatografiert. Der erste Peak enthielt reines IgGa, wie durch Immunelektrophorese mit Kaninchen-anti-Rattenserum nachgewiesen wurde.

IgE

Ratten-Ascites mit hohem Gehalt an IgE-Myelomprotein (IR 162) wurde freundlicherweise von Dr. H. Bazin, Universität von Louvain, Belgien, zur Verfügung gestellt. Myelom-IgE wurde hieraus nach der Methode von Isersky, Kulczycki und Metzger (1974) gereinigt. Eine IgE-reiche Fraktion wurde durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat bei 4° C erhalten. Die Proteinfraktion, die zwischen 38 und 52 % Ammoniumsulfat (pH 8.0) präzipitierte wurde gegen BBS (pH 8.0) dialysiert und anschließend auf eine Sephadex G-200-Säule gegeben. Der Hauptpeak wurde ankonzentriert und auf einer DEAE-Säule weiter aufgetrennt. Spuren von in der IgE-Fraktion verbliebenem IgG wurden durch Adsorption an eine anti-Ratten-IgG Immunadsorbenssäule entfernt. Das Immunadsorbens wurde hergestellt durch Kopplung der Gammaglobulinfraktion des IgG-spezi-

fischen Antiserums an Sepharose 4B (Pharmacia, Freiburg). Das so erhaltene IgE zeigte in der Immunelektrophorese eine Bande mit IgE-spezifischem Antiserum von der Ziege, präzipitierte jedoch nicht mit anti-IgG. Mit Kaninchen-anti-Rattenserum konnten außer IgE keine anderen Serumproteine nachgewiesen werden.
Diese IgE-Präparation wurde von Dr. König zur Verfügung gestellt.

C.II.2. Infektion von Ratten mit Nip. bras.

Die Infektion von Ratten mit Nip. bras. wurde nach der Methode von Ogilvie und Jones (1973) durchgeführt. Wistar-Ratten wurden subkutan mit 3.000 Larven infiziert und nach 4 bis 6 Wochen mit 5.000 Larven reinfiziert. Eine Woche nach der Zweitinfektion wurden die Tiere geblutet und zur Gewinnung von Mastzellen getötet.

C.II.3. Gewinnung von Nip. bras.-Antigen

Die Präparation des Antigens erfolgte wie von Ogilvie, Love, Jarra und Brown (1977) beschrieben. Adulte Würmer, gewonnen aus dem kleinen Intestinum von Ratten, die 8 Tage zuvor mit 3.000 Larven infiziert worden waren, wurden durch wiederholte Sedimentation in Kochsalz gewaschen und anschließend in einem Potter-Elvehjem Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde zweimal zentrifugiert (10 min, 1.400 g) und der Überstand mit BBS so verdünnt, daß die Präparation ungefähr 1.000 Wurmäquivalente/ml enthielt.

C.II.4. Antiseren

FlTC-konjugierte Antiseren

Fluoresceinkonjugierte Antiseren für fluoreszenzserologische Untersuchungen wurden alle von der Firma Nordic (Tilburg, Niederlande) bezogen. Verwendet wurden Kaninchen anti-Ratten-IgG, Kaninchen-anti-Maus-Fab und Ziegen anti-Meerschweinchen-IgG

AP-konjugierte Antiseren

Mit alkalischer Phophatase konjugiertes anti-Maus-Ig von der Ziege stammte von der Firma Medac, Hamburg. Dieses Serum wurde zum Nachweis monoklonaler Antikörper gegen RBL- und Mastzellen im ELISA benutzt.

Antiseren zur Identifizierung monoklonaler Antikörper von der Maus

Anti-Maus α, μ, γ_1, γ_{2a}, γ_{2b} und γ_3 stammten von der Fa. Meloy Laboratories Inc., Springfield, USA. Anti-κ und anti-λ von der Ziege wurden von Miles Laboratories, Elkhardt, USA, bezogen; anti-Maus-ε war ein Geschenk von Dr. Z. Eshar, Rehovot, Israel.
Diese Seren wurden zur Identifizierung monoklonaler Antikörper in der doppelten Immundiffusion nach Ouchterlony benutzt. Alle anderen Antiseren wurden selbst hergestellt und präpariert.

IgGa-anti-HSA aus der Ratte

Zur Herstellung von antigenspezifischem IgGa der Ratte wurden die Tiere mit HSA immunisiert: HSA (50 µg, Behring-Werke, Marburg) wurde in komplettem Freund's Adjuvans emulgiert und Wistar-Ratten in die Fußballen injiziert (200 µl pro Ratte). In Abständen von 2 Wochen wurden die Tiere mit der gleichen Menge Antigen reimmunisiert; das Antiserum wurde schließlich 10 Tage nach der 4. Injektion durch Entbluten der Ratten gewonnen. Die IgGa-Fraktion wurde wie beschrieben aus dem Serum isoliert (siehe C.II.1.) und immunelektrophoretisch auf Reinheit geprüft (mit Kaninchen-anti-normalem Rattenserum). Antigenspezifisches IgGa wurde wie folgt durch Immunadsorption präpariert: das IgGa wurde auf eine Sepharose 4B-HSA Säule gegeben (Volumen ca. 30 ml) und eine Stunde mit dem Immunadsorbens inkubiert. Dieser Vorgang wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, um nur die hochaviden Antikörper zu gewinnen.

Anschließend wurde das nicht gebundene Protein mit BBS (pH 8.0) von der Säule gespült und dann das antigen-spezifische IgGa mit Glycin-HCl (0.1 M, pH 3.0) eluiert. Nach sofortiger Neutralisation mit 1N NaOH wurde das Protein gegen BBS (pH 8.0) dialysiert und anschließend durch Ultrafiltration (Amicon, Witten) ankonzentriert. Eine Proteinbestimmung dieser Fraktion (n. Lowry) ergab einen Proteingehalt von 3 mg/ml.

IgGa-anti-SRBC aus der Ratte

Wistar-Ratten wurden, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, immunisiert, nur wurden anstelle des HSA 5×10^6 Schafserythrozyten verwendet. Die IgGa-Fraktion des Antiserums wurde isoliert und immunelektrophoretisch mit anti-normalem-Rattenserum vom Kaninchen auf Reinheit geprüft. Auf eine Präparation des antigenspezifischen IgGa wurde verzichtet.

Anti-normales Rattenserum und anti-Ratten-IgGa vom Kaninchen

Normales Rattenserum (500 - 1.000 µl) bzw. immunelektrophoretisch reines Ratten-IgGa (500 µg) in PBS (500 µl) wurden mit dem gleichen Volumen kompletten Freund's Adjuvans emulgiert und den Kaninchen i.m. gespritzt.
In Abständen von zwei Wochen erhielten die Tiere zwei "Booster"-Injektionen mit der gleichen Menge Antigen und wurden anschließend durch Herzpunktion (nach Äthernarkose) ausgeblutet. Das so gewonnene Serum wurde mit Ammoniumsulfat (50 %) präzipitiert, das Präzipitat gewaschen (in BBS + 50 %)Ammoniumsulfat), in BBS aufgenommen und gegen Na-Phosphatpuffer (0.005 M, pH 8.0) dialysiert. Die IgG Fraktionen der Seren werden durch Chromatografie über DEAE-Zellulose isoliert. Das Protein im Durchlauf (0.005 M Phosphatpuffer) bzw. bei Elution mit 0.015 M Phosphatpuffer wurde ankonzentriert und als Antiserumpräparation verwendet.

C.II.5. Markierung von Proteinen mit ^{125}J

Proteine wurde nach der Methode von Klinman und Taylor (1969) jodiert. Das Protein (50 - 300 µg) wurde gegen Na-Phosphatpuffer (0.3 M, pH 7.5) dialysiert und anschließend in ein Plastikröhrchen (Greiner, Nürtingen, Volumen ca. 5 ml) überführt. Nach Zugabe von $Na^{125}J$ (1-5 mCi in 10-100 µl, Amersham Buchler, Braunschweig) wurde die Reaktion durch Chloramin T (1 mg/ml, 1 µg/µg Protein) gestartet. Nach 1 min wurde die Jodierung mit einem 7-fachen molaren Überschuß an Natriumdisulfit gestoppt. Nach weiteren 60 Sekunden wurde die Reaktionsmischung mit BSA (3 % in Aqua dest.) als Trägerprotein auf 1 ml aufgefüllt. Das markierte Protein wurde in einen vorbereiteten Dialyseschlauch transferiert und bei Raumtemperatur gegen einen physiologischen Puffer der Wahl dialysiert (BBS, HBSS, TCM). Nach 18 Stunden Dialyse wurde der Puffer (500 ml) gegen frischen ausgetauscht und nochmals 18 Stunden dialysiert. Das Protein wurde vorsichtig aus dem Schlauch entfernt und bei 4° C oder -20° C aufbewahrt.

C.II.6. Herstellung von hitzeaggregiertem IgGa

Eine 2 %-ige Lösung von gereinigtem IgGa aus normalem Rattenserum wurde für 20 min auf 63° C erhitzt (Ishizaka und Ishizaka, 1960). Danach wurde Na_2SO_4 bis zu einer Endkonzentration von 0.62 M zugegeben und das entstandene Präzipitat durch Ultrazentrifugation (OTD 50, Sorvall, Bad Nauheim; SW 65 Rotor, Beckman Instruments, München) abgeschleudert (30 min, 158.000 g). Das Präzipitat wurde in BBS aufgenommen und mehrmals gegen denselben Puffer dialysiert. Diese Präparation fand für die Rosettenversuche und die indirekte Immunfluoreszenz Verwendung.

Die Präparation stabiler Hitzeaggregate mit verschiedenen Sedimentationskoeffizienten wurde nach einer modifizierten Methode von Kijlstra, Lentz und v. Es (1979) durchgeführt. Eine 2 %-ige IgGa-Lösung, der ^{125}J-IgGa (10 ng in 10 µl) als "Tracer" zugesetzt waren, wurde wie beschrieben erhitzt. Aggregate verschiedener Größe wurden über Sucrosedichtegradienten aufgetrennt. Die Gradienten hatten ein Volumen von 13.6 ml und eine Dichte von 10 - 40 % Sucrose (w/v in TCM). Die Probe (400 µl) wurde auf den Gradient aufgetragen und in einem SW 40 Rotor (Beckman Instruments, München) 5 Stunden (5° C, 280.000 g) zentrifugiert (OTD 50, Sorvall, Bad Nauheim). Der Gradient wurde anschließend mit Hilfe einer Ablaßnadel von unten durch Anstechen abgenommen und Fraktionen von 18 Tropfen gesammelt (ca. 500 µl). Die Aktivität jeder Fraktion wurde im Gammacounter gemessen (MAG 510, Berthold, Wildbad) und die Dichte im Refraktometer (Zeiss, Oberkochem) festgestellt. Die Sedimentationskonstanten der einzelnen Fraktionen wurden nach McEven (1967) bestimmt. Ein repräsentatives Beispiel einer solchen Zentrifugation ist in Abb. 2 dargestellt.

Wenn Moleküle im Dichtegradienten bei einer bekannten Sucrosekonzentration bandieren, so läßt sich mit Hilfe der folgenden Formel die Sedimentationskonstante berechnen:

$$S_{20,w} = \frac{\Delta I}{\omega^2 t}$$

ΔI = Zeitintegral, ω^2 = Radius^2/s^2, t = Zentrifugationszeit. Die Werte für ΔI und ω^2 lassen sich aus den vom Hersteller angegebenen Rotordaten und der Zentrifugationsgeschwindigkeit mit Hilfe von Tabellen berechnen.

Um Aggregate definierter Sedimentationskonstanten zu isolieren, wurden die korrespondierenden Fraktionen des Gradienten in Kollodiumhülsen (Sartorius Membranfilter, Göttingen) ankonzentriert und 2 Stunden gegen Na-Phosphatpuffer (0.3 M, pH 7.5) dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde nach der

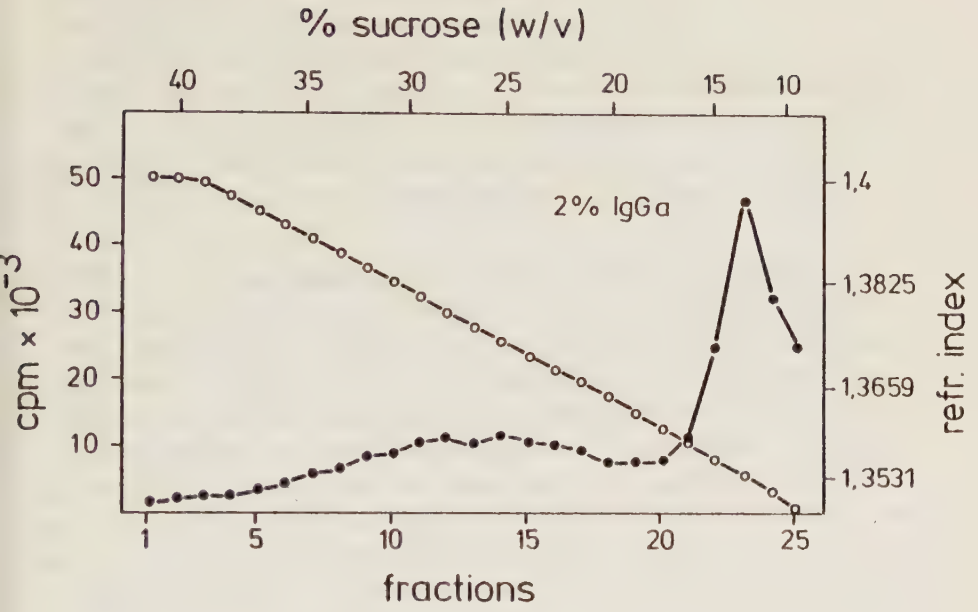

Abb. 2: Präparative Zonalzentrifugation von h.a.IgGa (2 %) in 10 - 40 % Sucrose (w/v); die Zentrifugationszeit betrug 5 St. bei 40.000 upm in einem SW 40 Rotor. ●—● Radioaktivität; o—o Refraktionsindex Der radioaktive Peak (Fraktionen 21 - 25) enthält monomeres IgGa und HSA.

Methode von Lowry, Rosenbrough, Farr und Randall (1951) bestimmt und die Aggregate anschließend mit ^{125}J markiert. Nach zweitägiger Dialyse gegen HBSS-Puffer wurden die markierten Aggregate zur Kontrolle ihrer Sedimentationskonstanten im Sucrosegradienten rezentrifugiert. Die Gradienten waren in HBSS-BSA bereitet (Kijlstra, Lentz und van Es, 1979), da die Zugabe von Trägerprotein die Hitzeaggregate stabilisiert. Das Elutionsbild der isolierten Aggregate ist in Abb. 3 dargestellt.

Die markierten Aggregate wurden in Portionen zu 25 µl bei - 20° C eingefroren. Jeweils direkt vor Gebrauch wurde ein Aliquot aufgetaut und mit HBSS-BSA verdünnt. Unlösliche Partikel wurden durch Zentrifugation (15 min, 2.500 g) entfernt. Zur Kontrolle der Sedimentationskonstanten wurde nach dem Experiment nochmals ein Dichtegradient gefahren. Die spezifische Aktivität des Proteins wurde im Radioimmunoassay bestimmt. Da sich dieser Wert durch entstehende unlösliche Partikel verändert, wurde diese Bestimmung von Zeit zu Zeit wiederholt und die veränderten Werte in die korrespondierenden Berechnungen mit einbezogen.

C.II.7. Radioimmunoassay (RIA)

Im RIA wurde die spezifische Aktivität der ^{125}J-markierten Aggregatpräparationen ermittelt. H.a.IgGa wurde aufgetaut, mit HBSS-BSA verdünnt und zur Entfernung unlöslicher Partikel zentrifugiert (15 min, 2.500 g). Der Überstand wurde für den RIA verwendet. Als Antiserum diente die IgG-Fraktion eines anti-IgGa vom Kaninchen (40 mg/ml). Da die Konzentration des ^{125}J-markierten Proteins so niedrig lag (im ng-Bereich), daß bei Reaktion mit dem Antiserum entstandene Präzipitate zu klein waren, um in einer normalen Laborzentrifuge abgeschleudert werden zu können, wurde dem Präzipitationsansatz "kaltes", d. h. nicht radioaktiv markiertes IgG zugesetzt. Der Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

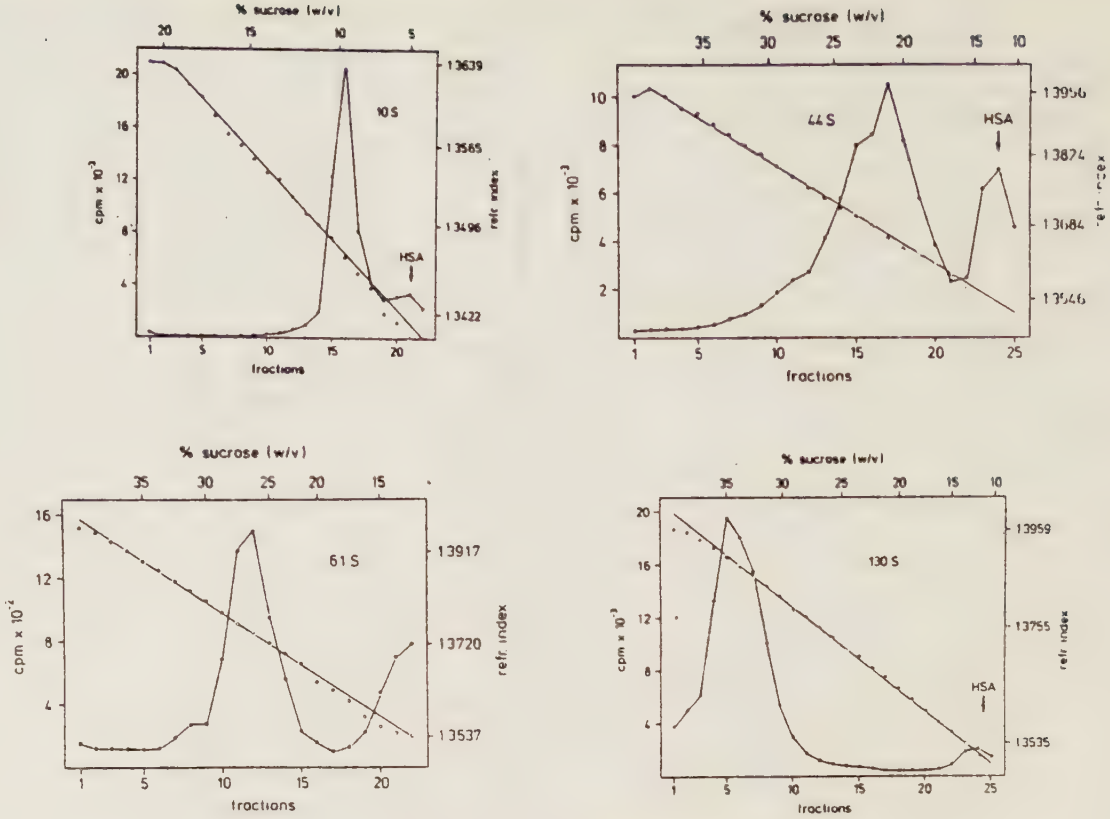

Abb. 3: Charakterisierung definierter Hitzeaggregate. Die Abb. zeigt die Elutionsbilder von vier Aggregaten verschiedener Sedimentationskonstanten im Sucrosedichtegradienten (10 - 40 %).

—•— Radioaktivität —o— Refraktionsindex

10 µl ^{125}J-h.a.IgGa
20 µl IgG (43 mg/ml, 1:20-1:40 000 verdünnt)
20 µl anti-IgGa (40 mg/ml, 1:10 verdünnt)
500 µl HBSS-BSA

Der Ansatz wurde in 5 ml Plastikröhrchen (Greiner, Nürtingen) gemacht und über Nacht (18 Stunden) bei 4° C rotiert. Dann wurden die Präzipitate abgeschleudert (30 min, 1.900 g), gewaschen (4 ml HBSS-BSA) und die Radioaktivität in Gammacounter gezählt. Die maximal präzipitierte Radioaktivität gibt den Prozentsatz des ^{125}J-markierten h.a.IgGa an den Gesamtcounts an. Aus diesem Wert kann unter Berücksichtigung der eingesetzten ^{125}J-h.a.IgGa-Verdünnung die spezifische Aktivität errechnet werden. In Abb. 4 ist das Ergebnis eines RIA dargestellt.

C.II.8. Kopplung von h.a.IgGa an Schafserythrozyten

Für diese Präparation wurde hitzeaggregiertes IgGa undefinierter Größe verwendet. Das Protein wurde mit Hilfe von $CrCl_3$ nach der Methode von Kofler und Wick (1977) an die Erythrozyten gekuppelt:
Eine $CrCl_3$-Lösung (1 %) in NaCl (0.9 %) wurde mit 1 N NaOH auf pH 5.0 eingestellt. Aus dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe in NaCl (0.9 %), enthaltend 0.02 M Acetatpuffer (pH 5.5), hergestellt. Um lösliches Protein zu entfernen, wurden die Schafserythrozyten fünfmal in physiologischer Saline gewaschen und anschließend zu einer 4 %-igen Zellsuspension resuspendiert. Um die für die Proteinkupplung optimale $CrCl_3$-Verdünnung zu ermitteln, wurde in einem Vorversuch ein Agglutinationstest durchgeführt. Proben der 2 %-igen Zellsuspension (5 ml) wurden mit verschiedenen $CrCl_3$-Verdünnungen (je 1 ml) versetzt (unter Rühren). Nachdem die Ansätze 10 - 15 min bei Raumtemperatur gestanden hatten, wurde diejenige $CrCl_3$-Konzentration ermittelt, die gerade keine sichtbare Agglutination der Zellen mehr verursachte. Dann wurde h.a.IgGa in NaCl (0.9 %) verdünnt bis zu Endkonzentrationen von 0.5, 1.0, 2.0 und 4.0 mg/ml. Die Erythrozyten (2 %-ig, 5 ml) wurden mit

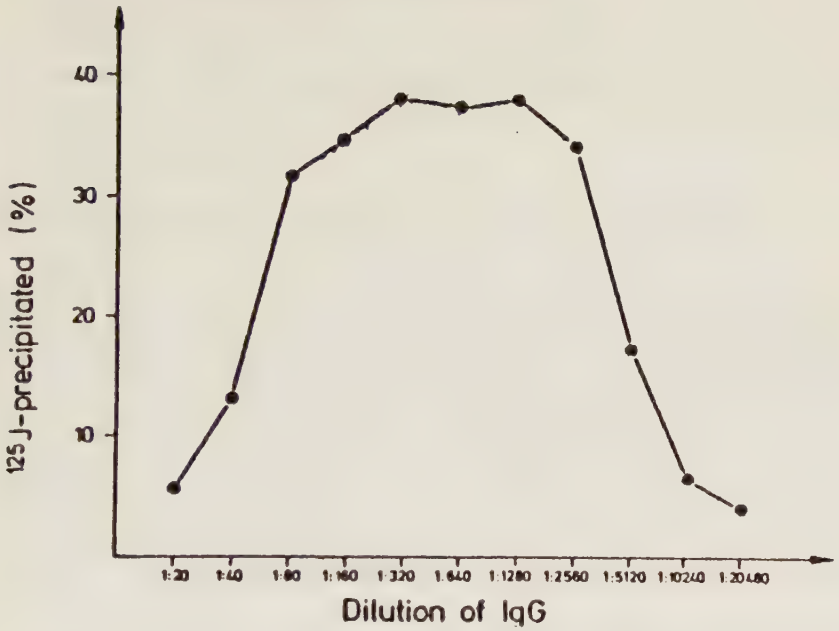

Abb. 4: Radioimmunoassay zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von ^{125}J-h.a.IgGa. Konstante Mengen ^{125}J-h.a.IgGa und Kaninchen anti-IgGa wurden mit verschiedenen Verdünnungen kalten IgG's inkubiert (18 St., 4° C). Abszisse: IgG-Verdünnung; Ordinate: Prozentsatz des präzipitierten ^{125}J-h.a.IgGa.

einem Teil (100 µl) jeder Lösung unter gleichzeitiger Zugabe von $CrCl_3$ (1 ml) verrührt und die Reaktion nach 5 min (Raumtemperatur) durch Zugabe von PBS (6.1 ml, pH 7.2) gestoppt. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen im selben Puffer gebrauchsfertig resuspendiert. Als Kontrolle für das Maß der Proteinkupplung diente ein Hämagglutinationsassay.

C.II.9. Herstellung von Ambozeptor-beladenen Schafserythrozyten

Als Ambozeptor diente die gereinigte IgGa-Fraktion eines Ratten-anti-SRBC Serums. Verdünnungen dieser Präparation wurden in VBS-EDTA hergestellt. Die Erythrozyten wurden zweimal in VBS-EDTA gewaschen (1.400 g) und auf eine Konzentration von 10^9 Zellen/ml eingestellt. Zur Beschichtung der Erythrozyten mit Ambozeptor wurde ein Volumenteil der Zellen mit einem Volumenteil Ambozeptor vermischt und inkubiert (20 min, 37° C). Anschließend wurde zweimal mit VBS-EDTA und zweimal mit TEDTA gewaschen. Die sensibilisierten Erythrozyten waren nun gebrauchsfertig.

C.II.10. Hämagglutinationsassay

Der Test diente zur Kontrolle der Beschichtung von SRBC mit h.a.IgGa bzw. antigenspezifischen IgGa. In einer Mikrotiterplatte (Greiner, Nürtingen) wurden 25 µl PBS (pH 7.2) pro Loch vorgelegt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe von Kaninchen-anti-Ratten-IgGa hergestellt, indem ins erste Loch 25 µl der konzentrierten Antiserumpräparation zugegeben wurden; von diesem Gemisch wurden 25 µl ins nächste Loch pipettiert usw. Die Kontrolle enthielt Puffer statt Antiserum. Nach nochmaliger Zugabe von PBS (25 µl) in jedes Loch wurde zuletzt die 2 %-ige Erythrozytenpräparation zugegeben (25 µl). Nach vorsichtigem Schütteln blieb die Platte bei Zimmertemperatur stehen bis die Zellen im Kontrolloch zu einem deutlich sichtbaren Knopf sedimentiert waren. Nun konnte der Hämagglutinationstiter als Maß für die Beschichtung der Zellen mit IgGa abgelesen werden.

C.II.11. Präparation von Immunkomplexen

C.II.11.1. Herstellung von Immunadsorbentien zur Isolierung antigen-spezifischer Antikörper (Cuatrecasas, 1970)

Sepharose-HSA

Sepharose 4B (30 g, Pharmacia, Freiburg) wurde zweimal in destilliertem Wasser gewaschen (10 min, 600 g) und dann mit $CNBr^-$ (3 g) bei pH 10-11 aktiviert. Die Sepharose wurde nun in einen Büchnertrichter transferiert und die Reaktion sofort mit kaltem destilliertem Wasser (0^o C, 200 ml) gestoppt. Nach gründlichem Waschen mit PBS (200 ml, 0^o C, pH 6.0) wurde die trockene Sepharose in einen Erlenmeyerkolben überführt; HSA wurde zugegeben (1 g in 30 ml PBS, pH 6.0) und das Gemisch bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert (über Nacht). Unter diesen Bedingungen wurden ungefähr 60 % des eingesetzten Proteins an die Sepharose gekuppelt. Um evtl. noch vorhandene freie Bindungskapazitäten abzusättigen, wurde das Adsorbens 1 Stunde in Äthanolamin (0.1 M in BBS, pH 8.0) gerührt. Anschließend wurde nacheinander mit Glycin-HCl (0.1 M, pH 3.0) und BBS (pH 8.0) gewaschen.
IgGa-anti-HSA aus der Ratte wurde mit Hilfe dieses Immunadsorbens wie beschrieben (siehe C.II.4.) gereinigt.

C.II.11.2. Präzipitationskurve nach Heidelberger (1935)

Die sogenannte "Heidelbergerkurve" dient der Darstellung und Analyse der quantitativen Verhältnisse bei Antigen-Antikörperreaktionen. In dieser Arbeit wurde sie als vorbereitender Versuch zur Isolierung definierter Immunkomplexe erstellt. Das Präzipitationssystem bestand aus HSA und der antigenspezifischen IgGa-Fraktion eines in der Ratte hergestellten Antiserums. Eine konstante Menge IgGa-anti-HSA (3 mg/ml, 10 µl) wurde mit verschiedenen HSA-Verdünnungen (1-60 µg, 10 µl) und

^{125}J-HSA (10 µl) als "Tracer" vermischt. Nach Zugabe von HBSS-BSA (500 µl) wurde der Ansatz über Nacht im Rotator inkubiert (4° C). Die entstandenen Präzipitate wurden abgeschleudert (30 min, 1.900 g), gewaschen und die Radioaktivität in Gammacounter gezählt. Die Überstände der Präzipitate, die lösliche Immunkomplexe enthielten, wurden zur weiteren Analyse in Sucrose-Dichtegradienten untersucht.

C.II.12. Kultivierung von RBL-Zellen

RBL-Zellen wurden nach der Methode von Kulczycki, Isersky und Metzger (1974) in Langzeitkulturen gezüchtet. Als Medium diente RPMI 1640 mit Zusätzen (siehe C.I.2.). Da es HEPES (15 mM) enthält, konnten die Zellen in CO_2-freier Athmosphäre (37° C) kultiviert werden (Water jacket incubator 3156, Labotect, Göttingen). Vor Gebrauch wurden die Zellen abgeschleudert und in physiologischem Puffer gewaschen.

C.II.13. Präparation von Ratten-Mastzellen

Ratten-Peritonealzellen wurden wie beschrieben (König und Ishizaka, 1976) gewonnen. Wistar-Ratten wurden entblutet und physiologischer Puffer (20 ml) in das Peritoneum injiziert. Nach kräftiger Massage des Abdomens wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette entnommen und sofort auf Eis gestellt. Nach nochmaligem Waschen mit Puffer (10 ml) wurden die gewonnenen Peritonealzellen zentrifugiert (10 min, 150 g) und in TEDTA-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension (1 ml) wurde nun auf 35 %-iges Ficoll im selben Puffer (4 ml) aufgetragen und zentrifugiert (30 min, 340 g, 4° C). Die sedimentierten Mastzellen wurden vom Ficoll befreit, gewaschen und in geeignetem Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung mit Türk's Lösung bestimmt; 85 % - 95 % der Gesamtzellzahl waren Mastzellen. Diese Zellpräparation wurde für radioaktive Bindungsversuche mit ^{125}J-IgE bzw. ^{125}J-IgGa verwendet.

Für die Durchführung der biologischen Versuche (Histaminsekretion und ^{45}Ca-Einstrom) wurden Mastzellen nach der Methode von Foreman, Hallet und Mongar (1977) gereinigt. Eine BSA-Lösung (36 %) in aqua dest. wurde mit einem Refraktometer exakt eingestellt. Diese Lösung wurde mit Tyrode-Puffer so verdünnt, daß Endkonzentrationen von 20 % bzw. 26 % BSA erreicht wurden. Aus diesen beiden Lösungen wurde nun ein Stufengradient hergestellt: Die 26 %-ige BSA-Lösung (1 ml) wurde in einem silikonisierten Glasröhrchen mit der 20 %-igen BSA-Lösung (1 ml) überschichtet. Die Peritonealzellsuspension (1 ml) wurde vorsichtig darüber gelegt und zentrifugiert (10 min, 130 g). Die pelletierten Mastzellen wurden von den in der Zwischenschicht befindlichen Peritonealzellen befreit und in Tyrode-Puffer gewaschen (10 min, 150 g). Der Anteil der Mastzellen an dieser Präparation betrug ebenfalls 85 - 95 %.

C.II.14. Methoden zum Nachweis der IgGa-Rezeptor-Interaktion

C.II.14.1. Immunfluoreszenz (Ishizaka, Chang, Taggart und Ishizaka, 1977)

RBL-Zellen (10^6) bzw. Mastzellen (2×10^5) in TEDTA-Puffer (100 µl) wurden für 30 min mit h.a.IgGa (50 µl, 6-8 mg/ml) bei 0° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Plastikröhrchen (5 ml Volumen, Greiner, Nürtingen) durch 12 %-iges Ficoll (2 ml) geschleudert (30 min, 340 g) und der Überstand abgesaugt. Das nun vom nicht gebundenen Protein getrennte Zellpellet wurde in TEDTA-Puffer resuspendiert (200 µl). Nach Zugabe von FITC-Kaninchen-anti-Ratten-IgG (10 µl) wurden die Zellen nochmals inkubiert (30 min, 0° C) und das nicht gebundene Antiserum durch erneute Ficollzentrifugation abgetrennt. Das Pellet wurde in TEDTA-Puffer aufgenommen (100 - 200 µl) und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Wetzlar) betrachtet. Um den Prozentsatz fluoreszierender Zellen zu bestimmen, wurden 100 - 200 Zellen ausgezählt.

C.II.14.2. Rosettenassay

RBL-Zellen (10^6) oder Ratten-Mastzellen (5×10^5) in TEDTA-Puffer (600 µl) wurden für 15 min bei Raumtemperatur mit Schafserythrozyten (5×10^7) inkubiert, die entweder mit antigenspezifischem IgGa sensibilisiert oder mit h.a.IgGa gekuppelt worden waren. Dann wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 80 - 90 g) und das Pellet vorsichtig resuspendiert. Nach Färbung mit Methylenblau wurden die Rosetten unter einem Leitz-Mikroskop untersucht; Zellen mit vier oder mehr Erythrozyten wurden als rosettenbildende Zellen gewertet.

C.II.14.3. Bindungsstudien mit ^{125}J-markierten Proteinen

Bindungsstudien mit ^{125}J-h.a.IgGa und ^{125}J-IgE wurden wie von Kulczycki, Isersky und Metzger (1974) beschrieben durchgeführt. RBL-Zellen (5×10^6) bzw. Mastzellen ($0.2 - 1 \times 10^6$) in Puffer (100 µl) wurden mit dem markierten Protein (10 - 20 µl) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen vorsichtig auf 12 %-iges Ficoll (250 µl in Tris-Puffer) in einem Mikroröhrchen aufgetragen (400 µl Volumen, Greiner, Nürtingen). Um die freie von der zellgebundenen Radioaktivität zu trennen, wurden die Röhrchen zentrifugiert (20 min, 300 g). Während die Zellen ein Pellet bildeten, wanderte die freie Radioaktivität nicht in das Ficoll ein. Das Pellet wurde mit einem Skalpell abgeschnitten und die Aktivität in Gammacounter (MAG 510, Berthold, Wildbad) gemessen.

C.II.15. Biologische Analytik

C.II.15.1. Messung des Calcium-Einstroms in RBL- und Mastzellen

Diese Versuche wurden nach einer modifizierten Methode von Foreman, Hallet und Mongar (1977) durchgeführt. Die Zellen, RBL-Zellen und Mastzellen von normalen und Nip. bras. infizierten Ratten, wurden zweimal in Tyrode-Puffer gewaschen

(10 min, 150 g) und resuspendiert. Bei Verwendung von Mastzellen wurden alle Versuche in Duplikaten durchgeführt, bei RBL- Zellen in Triplikaten. Aliquote der Zellsuspension (0.3 - 1 x 10^6 Mastzellen bzw. 5 x 10^6 RBL-Zellen in 200 µl) wurden im Wasserbad (37° C) vorinkubiert (ca. 5 min) um eine konstante Inkubationstemperatur zu erreichen. Soweit es sich um RBL-Zellen und Mastzellen von normalen Ratten handelte, wurden nun h.a.IgGa (20 µl) verschiedener Verdünnungen und ^{45}Ca (30 µl, 20 µCi/ml) gleichzeitig zugegeben. Wurden die Versuche mit Mastzellen von Nip. bras. infizierten Ratten gemacht, wurden die Zellen zunächst nur mit h.a.IgGa vorinkubiert (30 min); danach wurden anti-IgE verschiedener Verdünnungen (50 µl) und ^{45}Ca gleichzeitig zugegeben. Die Inkubation wurde durch Zugabe von eiskaltem TEDTA-Puffer gestoppt (4 ml). Nach sofortiger Überführung in ein Eisbad wurden die Zellen zweimal in TEDTA gewaschen (10 min, 150 g) und dann in Triton-X-100 (500 µl, 1 % in Aqua dest.) aufgenommen. Nach gründlichem Schütteln auf einem Quirler wurden sie zur Solubilisierung stehen gelassen (30 min bei Raumtemperatur). Das Solubilisat wurde anschließend in Szintillationsgefäße überführt (Baker Chemicals, Deventer, Holland) und mit Szintillatorflüssigkeit vermischt (6 ml, Aqua Luma plus, Baker Chemicals). Die Radioaktivität wurde im ^{14}C-Kanal eines Liquid Scintillation Spectrometers gemessen (Packard Tricarb, Modell 3255, Packard Instruments, Warrenville, USA).

C.II.15.2. Messung der Histaminsekretion von Mastzellen

Sekretionsexperimente wurden ausschließlich mit Mastzellen durchgeführt. Mastzellen von Nip. bras-infizierten Tieren (2 x 10^5) wurden mit verschiedenen h.a.IgGa-Verdünnungen (20 µl) inkubiert (30 min, 37° C). Danach wurden verschiedene Verdünnungen anti-IgE zugegeben (50 µl) und nochmals inkubiert (60 min, 37° C). Wurden Mastzellen von normalen Tieren benutzt,

wurde kein anti-IgE zupipettiert und die Inkubationszeit betrug 60 min. Am Ende der Inkubationsperiode wurde Tyrode-Puffer zugegeben (1 ml) und die Zellen abgeschleudert (10 min, 150 g). Aliquote des Überstandes (500 µl) wurden mit 2 %-iger $HClO_4$ versetzt (2 ml) und zentrifugiert (15 min, 1900 g). Durch diesen Schritt sollte Protein aus dem Überstand entfernt werden, da die Histaminmessung des Überstandes im Auto-Analyzer erfolgte (Technicon, Bad Vilbel), in den aus technischen Gründen nur proteinfreie Proben eingegeben werden können. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand gesammelt und der Gehalt an Histamin bestimmt.

C.II.16. Herstellung monoklonaler Antikörper

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den Fc-γ-Rezeptor auf Rattenmastzellen wurden die Milzzellen von Mäusen, die mit Rattenmastzellen hyperimmunisiert waren, mit Plasmozytomzellen fusioniert und anschließend auf die Produktion spezifischer Antikörper untersucht. Im Detail wurde hierbei wie folgt vorgegangen:

C.II.16.1. Immunisierung von Mäusen

Gereinigte Mastzellen (1 - 2 x 10^6) in PBS wurden im Verhältnis 1:1 (Vol./Vol.) mit komplettem Freund's Adjuvans emulgiert (Difco Laboratories, Detroit, USA) und 0.2 ml pro Tier und Injektion i.p., i.m., i.c. und in die Fußballen von Balb/c-Mäusen gespritzt. Mit Ausnahme der intraperitonealen Injektion, die bei den folgenden Immunisierungen vermieden wurde, um eine Entzündung des Peritoneums zu verhindern, wurden die Tiere in Abständen von 14 Tagen auf die gleiche Art sechsmal immunisiert.

C.II.16.2. RBL-Agglutinationsassay

Der Erfolg der Immunisierung wurde alle 4 Wochen in einem indirekten Agglutinationsassay (Coombs Test) überprüft. Aufgrund der Ähnlichkeit von Mastzellen und basophilen Leukozyten wurde dieser Test mit der RBL-Zelle als Zielzelle durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen durch Inkubation mit Giemsa-Lösung (1:20 in PBS, 30 min bei Raumtemperatur) blau angefärbt und anschließend 6 - 8 mal gewaschen (in PBS). Die Zellen wurden nun in hitzeinaktiviertem Mausserum resuspendiert (1:50 in PBS, 1 ml) und 1 Stunde inkubiert (37° C). Nach Abschleudern und nochmaligem Waschen in PBS waren sie für den Test gebrauchsfertig. In Mikrotiterplatten (Greiner, Nürtingen) wurden pro Vertiefung 25 µl PBS vorgegeben. Anschließend wurde durch Zugabe von Kaninchen-anti-Maus-Ig (25 µl) und sukzessives Verdünnen in der Platte eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Kontrolle enthielt Puffer statt Antiserum. Nach Zugabe der RBL-Zellsuspension (25 µl) wurden die Platten bei Raumtemperatur inkubiert (1 Stunde). Der Titer wurde als reziproke Antiserumverdünnung ausgegeben.

C.II.16.3. Kultivierung der Plasmozytomlinie

Die P3-NSI-1-Ag4-1 (NSI) Plasmozytomzellinie (Köhler, Howe und Milstein, 1976) wurde von Dr. Falkenberg zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in Gewebekulturflaschen bei 37° C in einer feuchten CO_2-Atmosphäre (8 %) angezüchtet. Sowohl die NSI-Zellen als auch später die Hybridomzellen wurden in DMEM gehalten. Vor der Fusion wurden die NSI-Zellen in 8-Azaguanin-haltiges (20 µg/ml) Medium überführt, um das Auftreten von HAT-resistenten Revertanten auszuschließen.

C.II.16.4. Fusion

Die Mäuse wurden 3 - 4 Tage vor der Fusion noch einmal immunisiert. Die Milz wurde steril entnommen und mit Stahlpinzetten in DMEM ohne Pferdeserum suspendiert. Die Suspension wurde 5 - 10 min auf Eis gestellt, um die großen Partikel zur Sedimentation zu bringen. Der Überstand mit den Zellen wurde abgenommen, gewaschen, in DMEM ohne Pferdeserum resuspendiert und gezählt.

Die NSI-Zellen wurden ebenfalls gewaschen, in DMEM ohne Pferdeserum resuspendiert und gezählt.

Milzzellen (10 Teile) und NS I-Zellen (1 Teil) wurden zusammengegeben und zentrifugiert (10 min, 100 g). Der Überstand wurde abgesaugt und anschließend wurde PEG-Lösung (2 ml PEG 1500, 41,7 %, w/v, Serva, Heidelberg) in RPMI 1640-Medium ohne HEPES tropfenweise zum Pellet gegeben. Die Zellen wurden dabei vorsichtig resuspendiert und in ein Wasserbad gestellt (1 min, 37° C). Dann wurde DMEM ohne Pferdeserum (35 ml) tropfenweise über einen Zeitraum von 20 - 25 min zugegeben (unter vorsichtigem Schütteln). Jetzt wurden die Zellen abgeschleudert und in DMEM mit Pferdeserum resuspendiert. Die lebenden NS I-Zellen wurden gezählt (Trypan-Blau Exklusion) und auf Zellkulturplatten verteilt (10^5 in 1 ml, Costar, Cambridge, USA).

C.II.16.5. Selektion der Hybridomzellen in HAT-Medium

Da bei der Fusion die Verschmelzung von Plasmozytomzellen und Milzzellen nicht spezifisch stimuliert wird, sondern prinzipiell jede Zelle aus der B-Zellinie als Fusionspartner akzeptiert wird, entsteht eine Mischung verschiedener Fusionsprodukte:

NSI:NSI, NSI:Milzzelle und Milzzelle:Milzzelle; daneben auch unfusionierte Zellen. Gewünscht ist aber nur die Kombination NSI:Milzzelle.
Um die Anzucht nur dieser Hybride zu erreichen, werden sie unter Ausnutzung eines Enzymdefekts in HAT-Medium selektioniert (Littlefield, 1964).

Das im HAT-Medium enthaltene Aminopterin blockiert als Folsäureantagonist die de novo Synthese von Purinen und Pyrimidinen. Wird gleichzeitig Hypoxanthin und Thymidin angeboten, bleibt die Nukleotidsynthese über einen alternativen Biosyntheseweg in Gang.

Die Plasmozytomzellinie NSI hat eine Mutation im X-Chromosomgekoppelten HGPRT-Locus und kann folglich keine intakte HGPRT synthetisieren (HGPRT = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase), daß als "Salvage"-Enzym in der Lage wäre, Purine und Pyrimidine aus Hypoxanthin und Thymidin als Vorstufen zu synthetisieren. Folglich können die NSI-Zellen nicht in HAT-Medium überleben.

Durch Fusion mit einer intakten, HGPRT-Zelle der B-Zellinie erhält die Plasmozytomzelle intaktes HGPRT-Genmaterial und kann daher in HAT-Medium überleben. NSI:NSI-Hybride und unfusionierte NSI-Zellen sterben ab. Auf Milzzellen und Milzzell:Milzzell-Hybride hat das HAT-Medium zwar keinen Einfluß, jedoch sterben Milzzellen in Kultur nach ca. 2 Wochen von selbst ab.

Ein Tag nach der Fusion wurde deshalb den Zellen HAT-Medium zugesetzt (1 ml pro Loch der Costarplatte). Nach einem weiteren Tag wurde 1 ml des Zellüberstandes abgesaugt und durch HAT-Medium ersetzt. Fünf Tage später wurde der gesamte Überstand gewechselt. Nach ca. 3 Wochen wurden die Zellen auf normales DMEM umgestellt.

C.II.16.6. Austestung der Klonüberstände

Die Kulturüberstände der Hybridzellen wurden ebenso wie spätere Antikörperpräparationen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Antigene der Mastzelle, vorzugsweise natürlich der Zellmembran, zu erkennen. Der Nachweis dieser anti-Mastzell-Antikörper erfolgte in der Immunfluoreszenz und einem radioaktiven Inhibitionstest, mit dessen Hilfe Antikörper gegen den Fc-γ-Rezeptor erkannt werden sollten. Sämtliche verwendeten Kulturüberstände wurden vor dem Test gegen Tyrode dialysiert.

Indirekte Immunfluoreszenz

Für diese Untersuchungen wurden 100 µl der Überstände eingesetzt. Die Inkubationsbedingungen waren wie schon beschrieben (C.II.14.1.), mit einer Ausnahme: die Zellen wurden zum Waschen nicht durch 12 %-iges Ficoll geschleudert, sondern mit Puffer zweimal gewaschen.

^{125}J-h.a.IgGa-Inhibitionstest

Als weiterer Versuch, die in der Fluoreszenz positiven Zellüberstände zu charakterisieren, wurde untersucht, ob sie die Bindung von ^{125}J-markiertem h.a.IgGa an Mastzellen inhibieren können. Zu diesem Zweck wurden Mastzellen (3×10^5 in 20 µl) mit den Zellüberständen (140 µl) und ^{125}J-h.a.IgGa (76 S, 10 µl) inkubiert (1 St., 37° C) und wie beschrieben durch 12 %-iges Ficoll abgeschleudert (siehe C.II.14.3.). Die Kontrolle enthielt gegen Tyrode dialysiertes Medium anstelle des Zellüberstandes.

C.II.16.7. Charakterisierung der Isotypen

Klasse und Subklasse der monoklonalen Antikörper sowie die Charakterisierung der leichten Ketten wurden mit Hilfe geeigneter Antiseren im Immundiffusionstest nach Ouchterlony bestimmt. Da der Antikörpergehalt der Kulturüberstände sehr niedrig ist (1-10 µg/ml), wurden die Zellüberstände vor Gebrauch durch Ultrafiltration (Amicon, Witten) auf 5-10 % ihres Volumens ankonzentriert.

C.II.16.8. Soft-Agar-Cloning

Einzelne Klone wurden durch die Technik des Soft-Agar-Cloning isoliert (Köhler, 1979). Das Prinzip dieser Methode besteht darin, die Hybridzellen in geeigneter Verdünnung so auszusäen, daß nach Wachstum der Zellen deutlich voreinander abgegrenzte, einzeln liegende Klone entstehen, die jetzt "gepickt" und neu angezüchtet werden können.

Eine 2 %-ige Agarlösung (Agar-Noble, Difco-Laboratories, Detroit, USA) in aqua dest. (steril) wurde in kochendem Wasser vorsichtig erhitzt und dann im 45° C-Wasserbad aufbewahrt. Zusätzlich wurden doppelt und einfach konzentriertes DMEM ohne Pferdeserum sowie Pferdeserum benötigt. Alle Reagenzien wurden vorgewärmt (45° C) und dann wie folgt zusammengegeben:

25 ml 2 % Agar
25 ml DMEM x 2
30 ml DMEM
20 ml Pferdeserum

Nach dem Mischen wurde der Weichagar (15 ml) in Petrischalen pipettiert (9 cm Durchmesser, mit Nocken, Falcon, Grenoble, Frankreich). Während der Agar fest wurde, wurden von den zu klonenden Hybridzellen Verdünnungen hergestellt (10^3, $3x10^3$ und 10^4/ml). Diese Verdünnungen (je 0.8 ml) wurden mit der Agar-DMEM-Mischung zusammengegeben (1.2 ml) und sofort auf den mittlerweile verfestigten Agar verteilt. Nach 5 min wur-

den die Petrischalen in den Inkubator (8 % CO_2) überführt. Mit bloßem Auge konnte man bereits nach 10 - 14 Tagen Klone erkennen. Sie wurden mit der Spitze einer ausgezogenen Pasteurpipette unter dem Binokular isoliert und in Mikrotiterplatten (Costar, Cambridge, USA, 8 x 12 Löcher) überführt. Ein bis zwei Wochen nachdem die Hybridzellen angewachsen waren, wurden sie in größeren Kulturplatten weitergezüchtet (Costar, 6 x 4 Löcher mit je ca. 2 ml Volumen). Die Überstände dieser Kulturen wurden mittels der Immunfluoreszenz bzw. des ^{125}J-h.a.IgGa-Inhibitionstests getestet. Positive Hybride wurden in großen Kulturflaschen gezüchtet (250 ml, Nunc, Wiesbaden), die Überstände ankonzentriert (100 - 200 ml) und für die Identifizierung der Antikörper verwendet.

C.II.16.9. Herstellung von Ascites (Fu-Tong Liu, et al, 1980)

Balb/c-Mäuse wurden mit Pristan i.p. gespritzt (0.5 ml, 2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecan, Aldrich Europe, Beerse, Belgien), um mittels der hierdurch induzierten Entzündung des Peritoneums bessere Bedingungen für das Anwachsen von Tumoren herzustellen. Nach 10 - 14 Tagen wurde Hybridomzellen i.p. injiziert ($1-5x10^6$ in 0.5 - 1 ml PBS), die nach weiteren 10 - 14 Tagen zur Ausbildung eines Tumors und zur Ascitesproduktion führten. Nachdem eine Kanüle durch das Bauchfell in das Peritoneum eingeführt worden war, konnte der Ascites abgenommen werden. Die Flüssigkeit wurde in vorgekühlten Glasröhrchen (4° C) mit 2 - 3 Tropfen Heparin (Novo, Mainz) aufgefangen. Die Tiere konnten in Abständen von 1 - 2 Tagen ca. 4 - 8 mal angezapft werden, bevor sie starben.
Der Ascites wurde zur Entfernung von Zellen unlöslichen Bestandteilen abgeschleudert (15 min, 600 g) und der klare Überstand eingefroren (- 20° C).

C.II.16.10. Anreinigung monoklonaler Antikörper aus dem Ascites durch Gelchromatografie

Ascites (18 ml) mit Antikörperaktivität gegen den Fc-γ-Rezeptor auf Mastzellen (getestet im ^{125}J-h.a.IgGa-Inhibitionstest) wurde mit Ammoniumsulfat (50 %) präzipitiert und gegen PBS (pH 7.4) dialysiert. Diese Proteinlösung wurde auf eine Sephadex S-300 Superfine-Säule aufgegeben (130 x 2.5 cm, Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg) und chromatografiert (Raumtemperatur, 9 Tropfen pro Minute). Es wurden Fraktionen zu 6 ml aufgefangen (99 Tropfen); die Extinktion bei 280 nm wurde gleichzeitig in einer Durchflußküvette gemessen (LKB-Uvicord, LKB, Gräfelfingen). Das Elutionsbild ist in Abb. 5 dargestellt. Die Fraktionen 56 - 69 wurden sofort gepoolt und ankonzentriert. Eine Proteinbestimmung nach Lowry ergab eine Konzentration von 3 mg/ml.
Wie durch vorherige Eichung der Säule und Identifizierung der Fraktionen in der Immundiffusion nach Ouchterlony festgestellt wurde, enthält der hier isolierte Peak die IgG-Fraktion des Ascites.

C.II.16.11. Einfrieren von Zellen (Mishell und Shiigi, 1980)

Plasmozytomzellen können in flüssigem Stickstoff eingefroren nahezu unbegrenzte Zeit erhalten werden, wenn sie vorher in spezielles Einfriermedium überführt werden (siehe C.I.2.). Hier wurden die Zellen in ca. 1 ml dieses Mediums aufgenommen (ca. 10^7 Zellen) und in verschraubbare Röhrchen umgefüllt. Anschließend wurden sie in Mull eingewickelt, in einen Styroporbehälter verpackt und bei - 70° C langsam eingefroren (um ein "Schockgefrieren" zu verhindern). Am nächsten Tag wurden sie in einen Stickstoffbehälter (Union Carbide, Durham, U.K.) versenkt (- 196° C). Bei Bedarf können sie aufgetaut und in kleinen Zellkulturfläschchen (50 ml, Nunc, Wiesbaden) neu angezüchtet werden.

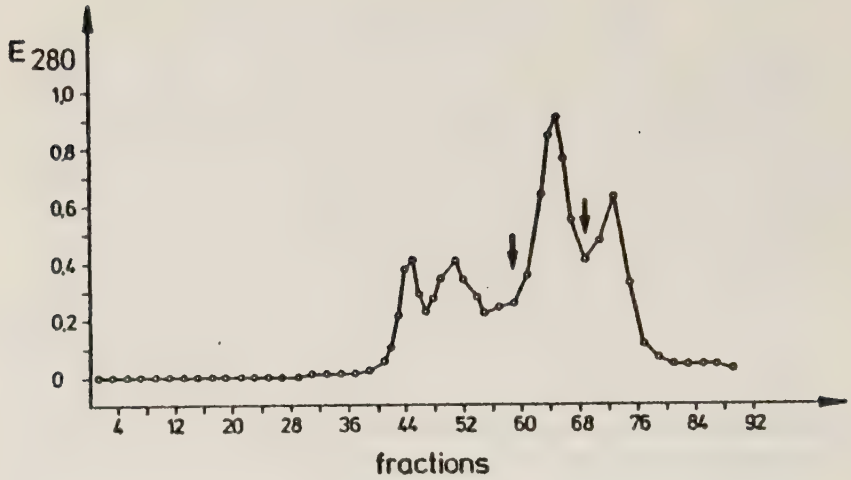

Abb. 5: Elutionsbild von Mäuse-Ascites (mit 50 % $(NH_4)_2 SO_4$ präzipitiert) über Sephadex-S-300 Superfine (130 x 2,5 cm). Die Fraktionen 56 - 69 enthalten IgG.

C.II.16.12. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA (Kearney, Radbruch, Liesengang und Rajewski, 1979) eignet sich gut, um die Bindung monoklonaler Antikörper an RBL- bzw. Mastzellantigene zu demonstrieren. Das Antigen wird an eine feste Phase gebunden und mit dem korrespondierenden Antikörper inkubiert. Anschließend wird ein gegen diesen Antikörper gerichteter Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert ist, zugegeben; bindet sich dieser Zweite Antikörper an den ersten, so kann man die Reaktion durch Zugabe des Substrats für die AP sichtbar machen (Farbreaktion). Der Test wurde im einzelnen wie folgt durchgeführt:

RBL-Zellen (3.3×10^8 in 4 ml) und Mastzellen (1.1×10^7 in 1 ml) in Na-Carbonatpuffer (0.2 M, pH 9.3) wurden sonikiert (10 x 30 sek.) und anschließend mikroskopisch kontrolliert. Die festen, unlöslichen Bestandteile wurden abgeschleudert (10 min, 2.500 g) und der Überstand verwendet. Hiermit wurden Mikrotiterplatten (Flow, Bonn) beschickt (200 µl pro Loch) und bei Raumtemperatur inkubiert (30 min). Das RBL-Zellsonikat wurde in einer Verdünnung von 1:3 verwendet, das Mastzellsonikat wurde auf ein Volumen von 3.2 ml eingestellt und in dieser Konzentration verbraucht. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgesaugt und die nicht besetzten "Bindungsstellen" der Mikrotiterplatte wurden durch Inkubation (10 min, Raumtemperatur) mit Inkubationspuffer (300 µl) abgesättigt. Nach dem Absaugen wurde mit Waschpuffer (300 µl) nachgespült.

Jetzt wurde der monoklonale Antikörper (200 µl) in einer Verdünnungsreihe (logarithmisch) zugegeben und eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt und es wurde einmal mit Waschpuffer (300 µl) gewaschen.

Als nächster Schritt wurde nun der AP-konjugierte Antikörper (200 µl) eingesetzt. Die Gebrauchsverdünnung dieser Präparation mußte in vorhergehenden Tests ermittelt werden. Im An-

schluß an die Inkubation (1 St., 37° C) wurde 4 mal mit Waschpuffer gewaschen (300 µl). Zur Farbentwicklung wurden die Platten im letzten Schritt mit Substratpuffer (200 µl) inkubiert (37° C). Die Färbung wurde bei 405 nm gemessen (Titertek Multiscan, Flow, Bonn).

C.II.17. Methoden zur Charakterisierung des Fc-γ-Rezeptors

C.II.17.1. Enzymatische Markierung von Zellmembranen mit ^{125}J

Die Markierung von Proteinen mit ^{125}J durch Verwendung von Lactoperoxidase (Morrison und Bayse, 1970) wurde wie im Detail von König und Ishizaka (1976) beschrieben für die Oberflächenmarkierung von Zellmembranen angewendet. Es wurden eine 0.1 M KJ-Lösung und eine 2.3 mM H_2O_2-Lösung in PBS (pH 7.4) angesetzt. Lactoperoxidase (Sigma Chemicals, München) wurde in PBS aufgelöst (1 mg/ml). Anschließend wurde eine Markierungsmischung folgender Zusammensetzung hergestellt:

2 µl	0.1 M KJ	= 10 µM
20 µl	^{125}J	= 1 - 2 mCi
20 µl	Lactoperoxidase	= 1 µM
958 µl	PBS	

Hierzu wurden RBL-(3 x 10^7 in 1 ml) bzw. Mastzellen (10^7 in 1 ml) in PBS gegeben (Raumtemperatur) und leicht geschüttelt. Dann wurden über 12 Minuten alle 30 sek. 10 µl der H_2O_2-Lösung zupipettiert. Anschließend blieb der Ansatz 5 Minuten stehen und wurde dann mit 0.5 ml der 0.1 M KJ-Lösung versetzt. Die Zellen wurden nun abgeschleudert (10 min, 150 g) und 5 mal in PBS gewaschen. Nach der Resuspendierung in PBS waren sie gebrauchsfertig.

C.II.17.2. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Sämtliche in der SDS-PAGE aufgetrennten Proben wurden vor dem Lauf in Probenpuffer aufgenommen und zur Denaturierung der Proteine aufgekocht (3 - 5 min).

Die hier verwendeten SDS-Polyacrylamid-Flachgele (90x14x1 mm) wurden nach der Methode von Laemmli (1970) und Maizel (1971) hergestellt. Die Vernetzung der Acrylamid-Stammlösung wurde mit Bisacrylamid im Verhältnis 1:0.026 erreicht. Für die Auftrennung der verschiedenen Proben wurden 7.5 %- und 10 %-Gele verwendet. Um eine schärfere Bandenverteilung zu erreichen, wurde über dieses Trenngel noch ein Sammelgel gegossen.

Nach dem Einbau des Gels in die Elektrophoreseapparatur wurden die Puffergefäße mit Elektrodenlaufpuffer gefüllt. Pro Geltasche wurden 10 - 50 µl Probe aufgetragen (10 - 30 µg) und mit 20 mA gefahren (3.5-4 St.).

Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die Gele mit TCA (50 %) fixiert (30 min) und mit Coomassie gefärbt (15 min). Danach wurden die Gele sofort getrocknet (Geltrockner von Biorad, München).

C.II.17.3. Autoradiografie

Auf die getrockneten Gele wurde ein Röntgenfilm (XR-5, Kodak, Stuttgart) und eine Verstärkerfolie (Cronex Hi plus, Dupont, Bad Nauheim) gelegt, um die Sensitivität zu erhöhen (10 - 20-fach). Nach der Exposition wurden die Filme 3 min entwickelt (LX 24, Kodak) und 5 min fixiert (Al 4, Kodak).

C.II.17.4. Molekulargewichtsbestimmungen

Für Molekulargewichtsbestimmungen in der SDS-PAGE wurden Eichproteine definierter Molekulargewichte benutzt (Weber und Osborne, 1969): ß-Galaktosidase (130.000 dalton), Phosphorylase a (94.000 dalton), Rinderserumalbumin (68.000 dalton),

Katalase (60.000 dalton), Glutamatdehydrogenase (53.000 dalton), Aldolase (40.000 dalton), Carboanhydrase (29.000 dalton), Chymotrypsinogen A (25.000 dalton), Myoglobin (17.000 dalton) und Cytochrom c (12.400 dalton). Cytochrom c und Glutamatdehydrogenase stammten von Boehringer, Mannheim; alle anderen Proteine von Serva, Heidelberg.

C.II.17.5. Immunpräzipitation

Mit h.a.IgGa und anti-IgGa

RBL-Zellen wurden mit ^{125}J oberflächenmarkiert (1mCi). Um freies ^{125}J zu entfernen, wurden die Zellen 5 mal in PBS gewaschen (10 min, 150 g). Für die Anlagerung von h.a.IgGa wurde ein Aliquot der Zellen (10^7 in 300 µl) mit hitzeaggregiertem IgGa undefinierter Größe (6 mg/ml, 50 µl) inkubiert (1 St. bei 37° C). Dann wurde 2 %-iges NP 40 (350 µl) zugegeben und die Zellen eine Stunde im Eisbad (4° C) stehen gelassen. Nach der Solubilisierung wurden unlösliche Partikel durch Zentrifugation abgetrennt (15 min, 4.000 g). In einem anschließenden RIA wurde versucht, h.a.IgGa-Rezeptorkomplexe mit anti-IgGa vom Kaninchen zu präzipitieren.

Mit monoklonalen Antikörpern und Protein A

Komplexe aus Fc-Rezeptor und monoklonalem anti-Rezeptor-Antikörper sollten mit Hilfe von Protein A immunpräzipitiert werden. Hierbei wurde nach der von Kessler (1975) beschriebenen "Protein A Antikörper Adsorbens Technik" vorgegangen.

Gibt man zu IgG-haltigen Immunkomplexen Staphylococcensuspension dazu, wird das IgG über sein Fc-Stück an das in der Zellwand enthaltene Protein A gebunden und präzipitiert. Dadurch kann auf den Gebrauch von Antiseren verzichtet werden.

Staphylococcus aureus, Stamm CowanI, wurde in Formaldehyd (1.5 %) fixiert und für 5 min auf 80° C erhitzt. Die Bakterien wurden in Na-Phosphatpuffer (40 mM, pH 7.2) in NaCl (0.15 M) resuspendiert und bei - 20° C gelagert.

Aufgetaute Bakterien wurden vor Gebrauch 3 mal in NET-Puffer gewaschen (5 min, 3.000 g) und im selben Puffer 10 %-ig resuspendiert. Diese Präparation wurde für die eigentliche Immunpräzipitation verwendet.

Mastzellen (10^7 in 1 ml) wurden mit ^{125}J oberflächenmarkiert (5 mCi), 5 mal gewaschen und in 400 µl PBS resuspendiert. Ein Aliquot davon (200 µl) wurden mit monoklonalem anti-Fc- (500 µl einer Ascitespräparation, über Sephacryl S-300 chromatografiert, 3 mg/ml) inkubiert (1 Std. bei 37° C). Dann wurde NP 40 in PBS zugegeben (Endkonzentration 1 %) und 2 Stunden solubilisiert (4° C). Unlösliche Partikel wurden abgeschleudert (15 min, 4.000 g) und der Überstand (ca. 700 µl) mit Staphylococcensuspension (700 µl, 10 %-ig) im Rotator inkubiert (18 St., 4° C). Anschließend wurden die Bakterien abgeschleudert und je 2 mal in NET-Puffer mit 0.5 %, 0.1 % und 0.05 % NP40 gewaschen. Zum Staphylococcensediment wurde Probenpuffer für die SDS-PAGE gegeben (100 µl) und die Suspension gekocht (5 min). Nach Zentrifugation wurde der Überstand für die SDS-PAGE verwendet.

C.II.17.6. Elektrophoretischer Proteintransfer aus SDS-Polyacrylamidgelen in Nitrocellulosefilter

Das Prinzip dieser Methode ist folgendes: Mastzellextrakt wird in der SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine auf elektrophoretischem Wege aus dem Gel auf einen Nitrozellulosefilter transferiert, der nun das genaue Ebenbild des Bandenmusters im Gel darstellt. Da die Proteine nicht in den Filter einwandern, sondern auf dem Filter liegenbleiben, sind sie nun für immunologische Verfahren leicht zugänglich. Monoklonale Antikörper gegen die Mastzellmembran binden an die korrespondierende Antigenbande und können dann im Sandwichverfahren mit einem ^{125}J-markierten anti-Antikörper sichtbar gemacht werden in der Autoradiografie. Im ein-

zelnen wurde mit leichten Modifikationen nach der Methode von Towbin, Staehelin und Gordon (1979) vorgegangen.

Mastzellextrakt wurde in einem 7.5 %-igen Gel aufgetrennt wie beschrieben. Zur besseren Handhabung wurde das Gel anschließend sofort in zwei Teile geschnitten. Die beiden Stücke wurden auf Filterpapier gelegt (Whatman, Springfield, Mill, Maidstone, USA), welches zuvor gründlich in Transferpuffer eingeweicht worden war. Nitrozellulosepapier (BA 85, 0.45 µM Porengröße, Schleicher und Schüll, Dassel) wurde in den beiden Gelteilen entsprechende Stücke geschnitten und luftblasenfrei vorsichtig auf eine Wasseroberfläche gelegt. Nachdem es sich mit Wasser vollgesaugt hatte, wurde es, ebenfalls luftblasenfrei, auf das SDS-Gel gelegt und dann mit mehreren Lagen Filterpapier bedeckt. Das Gel mit dem Filter wurde in das Haltenetz eines Gel-Destainers eingelegt (Pharmacia Freiburg, Modell GD-4) und, mit dem Nitrozellulosefilter zur anodalen Seite gewendet, in die Entfärbekammer mit Transferpuffer gehängt. Zwischen die beiden Plattenelektroden des Destainers und das Haltenetz wurden saubere Lappen geklemmt (Scotch Brite), um das Gel zu arretieren. Nun wurde ein Batterieladegerät (Privileg, Quelle) angeschlossen und mit einer Stromstärke von 2 - 3 A wurden die Proteine aus dem Gel auf den Filter transferiert (8 Std.).

Der Filter, der jetzt ein exaktes Abbild des Polyacrylamidgels darstellte, wurde dann herausgenommen. Eine auf den Filter transferierte Gelspur wurde dann abgeschnitten und zur Kontrolle des Transfers mit Amidoschwarz angefärbt (5 min). Nach dem Entfärben waren deutliche Proteinbanden zu erkennen. Eine Kontrollfärbung des Gels zeigte, daß der Transfer nahezu quantitativ stattgefunden hatte.

Der nicht gefärbte Teil des Filters wurde in Beschichtungspuffer eingdegt, um die freien "Bindungsstellen" mit BSA abzusättigen (2 St.). Nach mehrmaligem Waschen in Waschpuffer (3 - 5 mal) wurde der Filter mit anti-Fc-γ-Antikörpern beschichtet (0.5 ml pro Gelspur, 30 - 300 µg) und in einer

feuchten Kammer inkubiert (3 St., 37° C). Anschließend wurden die Filter in Waschpuffer gewaschen (5 mal) und mit dem zweiten Antikörper beschichtet, d. h. ^{125}J-markiertem anti-Maus-Immunglobulin vom Kaninchen (1.5 µCi in 0.5-1 ml pro Gelspur).

Nach Inkubation in der feuchten Kammer (6 St., 37° C) wurden die Filter gründlich in Waschpuffer gewaschen (5 mal), getrocknet und einem Röntgenfilm exponiert (1 - 2 Wochen bei Raumtemperatur).

C.II.17.7. Direkter immunologischer Nachweis des Rezeptors in SDS-Polyacrylamidgelen

Die Technik wurde wie von Burridge (1976) und Lane und Hoeffler (1980) beschrieben, durchgeführt. Mastzellextrakt wurde wie beschrieben, durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einem Fixierbad geschüttelt (2 St.) und anschließend in Puffer A äquilibriert. Das Gel wurde nun mit anti-Fc-γ-Antikörpern beschichtet (0.5 - 1 ml in Puffer A pro Gelspur, 30 - 300 µg) und in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert (Raumtemperatur). Nach ausgiebigem Waschen in Puffer A (72 St.) wurde ^{125}J-anti-Maus-Immunglobulin vom Kaninchen zugegeben (2 - 3 µCi pro Gelspur in 1 - 2 ml Puffer A) und nochmals über Nacht inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen in Puffer A (72 St.) wurde das Gel einem Röntgenfilm exponiert (1 - 2 Wochen bei Raumtemperatur).

C.II.18. Proteinbestimmung

Nach Lowry (1951)

Die unbekannte Proteinlösung (100 µl) wurde mit SDS-Reagenz (50 µl) und Reagenz A (1 ml) versetzt und sofort gut vermischt. Nach 10 min (Raumtemperatur) wurde Folin-Cioucalteau-Reagenz (100 µl, Merck, Darmstadt) zupipettiert und geschüt-

telt. Nach der Inkubation (30 min bei Raumtemperatur) wurde die Extinktion bei 720 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Eichkurve mit HSA bestimmt.

Mit Coomassie Blue

Die Methode nach Bradford (1976) wurde in einer modifizierten Form verwendet (Sedmak und Grossberg, 1977). Die Proteinlösung (0.5 ml) wurde mit Coomassie Blue G 250 (0.06 %-ig in 2.2 %-iger HCl, Serva, Heidelberg, 0.5 ml) vermischt und 2 min stehen gelassen (Raumtemperatur). Die Extinktion wurde bei 620 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Eichkurve mit BSA bestimmt.

C.II.19. Immunelektrophorese

Objektträger wurden mit 1 %-igem Immunelektrophoreseagar beschichtet (3 - 4 ml) und dann wie folgt behandelt: Mit Hilfe eines Gelstempels (Gelman Instruments, Ann Arbor, Michigan, USA) wurde in der Mitte des Objektträgers eine Rinne gestanzt und auf jeder Seite, etwas polar gelegen, ein kreisförmiges Loch. Die Löcher wurden mit einer Pasteuerpipette gesäubert und erhielten nun die Probe des zu charakterisierenden Antigens (10 µl). In einer Elektrophoresekammer (Gelman Instruments) wurde eine Spannung von 250 Volt (ca. 10 mA) angelegt (1.5 St.). Da der Elektrodenpuffer (Merck, Darmstadt) einen pH von 8.6 hat, wandern die meisten Proteine unter diesen Bedingungen zur Anode. Nach der Elektrophorese wurde die Rinne in der Mitte des Objektträgers mit einem Spatel (Gelman Instruments) von der Agarose befreit und das Antiserum wurde aufgetragen (25 - 50 µl). Die Elektrophorese wurde über Nacht in einer feuchten Kammer entwickelt.

C.II.20. Immundiffusion nach Ouchterlony (1958, 1962)

Zum qualitativen Nachweis sowie zur Charakterisierung des Verwandschaftsgrades verschiedener Antigene wurden diese mit Hilfe geeigneter Antiseren in der doppelten, radialen Immundiffusion nach Ouchterlony ausgetestet. Hierzu wurden Objektträger mit 1 %-igem Immunelektrophoreseagar beschichtet (3 ml). Mit einem Metallstempel (Gelman Instruments, Ann Abor, Michigan, USA) wurden Löcher in das Gel gestanzt und Antikörper und Antigen gegeneinander aufgetragen (je 10 µl). Bis zur Entwicklung von Präzipitationsbanden wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

D. Ergebnisse

D.I. Nachweis des Fc-γ-Rezeptors auf Mastzellen und RBL-Zellen durch Rosettentechnik und indirekte Immunfluoreszenz

Zu Beginn der Versuche stand das Bemühen, einen möglichst einfachen, zunächst vorwiegend qualitativen Nachweis der Existenz einer Bindungsstelle für Ratten-IgGa auf der Ratten-Mastzelle und der RBL-Zelle zu finden. Hier boten sich die Standardmethoden der Rosettentechnik und der Immunfluoreszenz an.

D.I.1. Rosettentechnik

Eine IgGa-Lösung (2 %-ig) in BBS (pH 8.0) wurde auf 63° C erhitzt (20 min). Nach Fällung mit Na_2SO_4 (0.62 M) und anschließender Dialyse gegen NaCl (0.15 M) wurden die hinsichtlich ihrer Größe nicht näher spezifizierten Hitzeaggregate mit Hilfe von $CrCl_3$ an Schafserythrozyten (SRBC) gekuppelt. Diese Zellpräparation wurde mehrfach gewaschen und dann mit Mastzellen von normalen als auch von mit Nip. bras. infizierten Tieren sowie mit RBL-Zellen inkubiert (Abb. 8). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Alle drei Zellpräparationen sind offensichtlich in der Lage h.a.IgGa an ihre Membran zu binden, obwohl der Prozentsatz der rosettenbildenden Zellen unter den RBL-Zellen eindeutig niedriger liegt als bei den Mastzellen.

Bemerkenswert ist der Vergleich zwischen Mastzellen von normalen und Nip. bras. infizierten Ratten. Im Verlauf einer Infektion mit dem Wurm kommt es im befallenen Tier zu einer erhöhten IgE-Antikörperproduktion (Ishizaka, König, Kurata, Mayer und Ishizaka, 1975). Das IgE bindet sich an den korrespondierenden Fc-ε-Rezeptor und bleibt hier über Wochen ge-

	INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE	ROSETTE FORMATION (H.A. - SRBC)
RBL	100 %	10,5 %
MC	100 %	48 %
MC INF.	100 %	55 %

Tabelle 1: Nachweis der Bindung von h.a.IgGa durch Rosettenbildung und indirekte Immunfluoreszenz.
MC = Mastzellen; MC inf. = Mastzellen von Nip. bras infizierten Ratten; h.a.-SRBC = Schafserythrozyten, an die h.a.IgGa gekuppelt wurde.

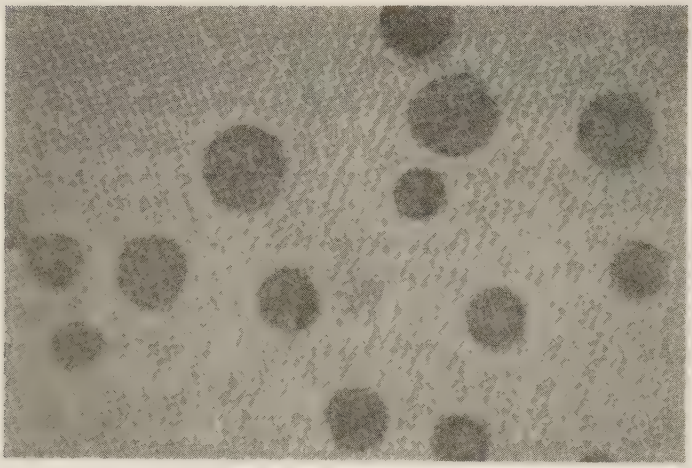

Abb. 6: Ratten-basophile Leukämiezellen (RBL-Zellen). Färbung mit Toluidinblau; Vergrößerung 300-fach.

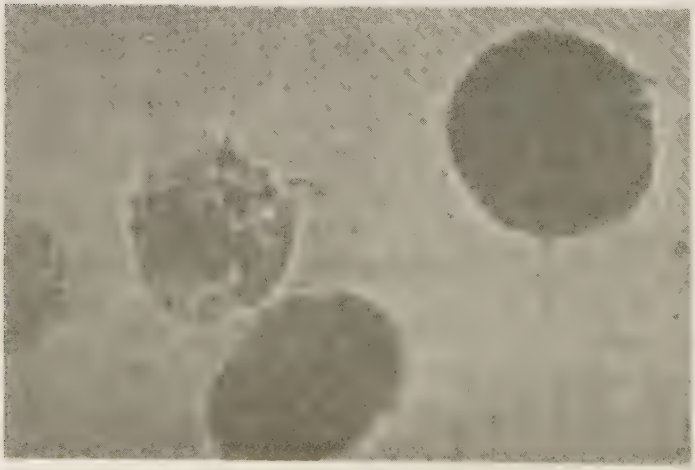

Abb. 7: Rattenmastzellen. Färbung mit Toluidinblau; Vergrößerung 300-fach.

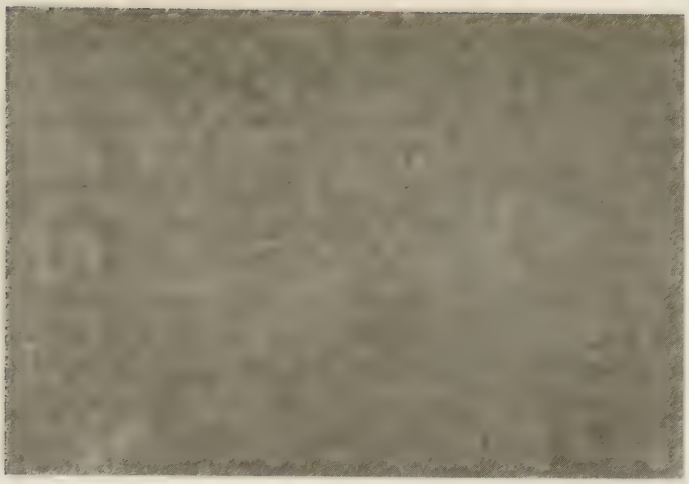

Abb. 8: Rosettenbildung von Mastzellen mit h.a.IgGa-beschichteten Schafserythrozyten. Färbung mit Giemsa; Vergrößerung 300-fach.

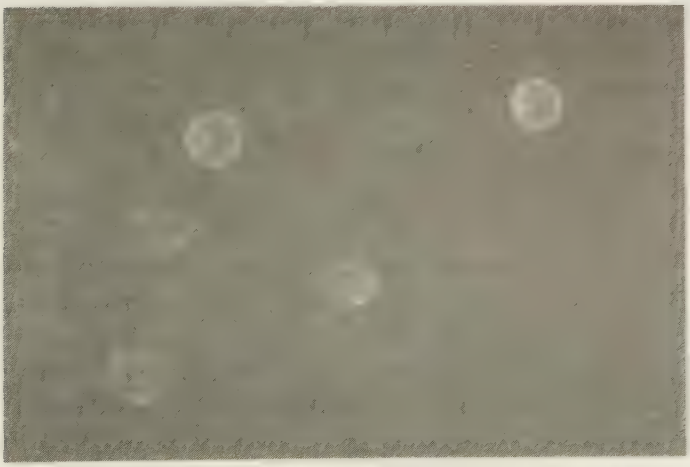

Abb. 9: Indirekte Immunfluoreszenz von Mastzellen. Nach Vorinkubation der Zellen (2×10^5) mit h.a.IgGa (300 µg) wurde mit FITC-anti-Ratten-IgG angefärbt (10 µl). Vergrößerung 200-fach.

bunden. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, steht eine Besetzung der IgE-Rezeptoren durch ihre korrespondierenden Antikörper einer Interaktion der Membran mit h.a.IgGa nicht im Wege.

Ähnliche Daten ergaben sich, wenn statt der aggregatbeladenen SRBC-Präparation Erythrozyten verwendet wurden, die mit antigenspezifischem IgGa sensibilisiert waren. Der Prozentsatz der rosettenbildenden Zellen lag zwar im Ganzen erheblich niedriger (7 - 19 %), zeigte aber insbesondere bezüglich der beiden Mastzellpräparationen ein durchaus vergleichbares Bild.

D.I.2. Indirekte Immunfluoreszenz

RBL-Zellen und Mastzellen von normalen wie auch von Nip. bras. infizierten Ratten zeigten nach Vorinkubation mit h.a.IgGa eine breite, membrangebundene Fluoreszenz bei Zugabe von FITC-markiertem anti-Ratten-IgG (Tabelle 1, Abb. 9).

Diese mit zwei verschiedenen Methoden erhaltenen Ergebnisse sind ein eindeutiger Beleg für die Existenz einer membrangebundenen Bindungsstelle für IgGa auf Mastzellen und RBL-Zellen. Diese Bindungsstelle scheint nicht identisch zu sein mit derjenigen für das Immunglobulin E; ihre Zahl scheint auf Mastzellen größer als auf RBL-Zellen zu sein.

D.II. Bindungsstudien mit ^{125}J-markiertem h.a.IgGa an Mast- und RBL-Zellen

Im folgenden Abschnitt soll versucht werden, unter Verwendung radioaktiv-markierten h.a.IgGa's definierter Sedimentationskonstanten ein präzises Bild der Liganden-Rezeptor-Interaktion zu zeichnen. Die Hitzeaggregate (10, 44, 61 und 130 S) wurden wie im Methodenteil beschrieben hergestellt, mit ^{125}J markiert und unter Verwendung eines BSA-haltigen Puffers

(HBSS + 0.5 % BSA) bei - 20° C in kleinen Aliquoten (25 µl) eingefroren. Parallel zu jedem Bindungsexperiment wurde die Stabilität der Aggregatgröße durch eine Kontrollzentrifugation im Sucrose-Dichtegradienten untersucht. Die spezifische Aktivität der verschiedenen Antikörperpräparationen lag je nach Alter zwischen 0.5 und 3 µCi pro µg Protein.

Um den Anteil der proteingebundenen ^{125}J-Moleküle an der Gesamtradioaktivität zu bestimmen, wurde ein Radioimmunassay (RIA) durchgeführt. Da die Stabilität der Hitzeaggregate über längere Zeit nicht unbegrenzt ist, sondern eine Tendenz zur spontanen Aggregation zu größeren, unlöslichen Partikeln besteht, mußte der Anteil der löslichen, im RIA präzipitierbaren counts an der Gesamtcountzahl ca. alle 2 - 3 Wochen neu ermittelt werden.

Zur Charakterisierung der Bindung des IgGa an seinen Rezeptor wurden verschiedene Parameter untersucht, die im folgenden der Reihe nach behandelt werden sollen. Als Zielzelle diente die in Kultur gehaltene RBL-Zelle, die sich aus zeitökonomischen Gründen gegenüber der Mastzelle zur Verwendung anbot. Einzelne Versuche wurden dennoch zusätzlich mit Mastzellen durchgeführt, wenn es von Wichtigkeit erschien. Abb. 10 zeigt eine Wachstumskurve von RBL-Zellen in RPMI 1640 Medium. Das Zellwachstum wurde anhand der Extinktion bei 578 nm verfolgt unter Kontrolle der Viabilitätsrate mit Trypanblau. Für die durchgeführten Bindungsstudien wurden nur Zellpräparationen mit einer Viabilitätsrate von mindestens 80 % benutzt.

D.II.1. Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Bindung

RBL-Zellen (5 x 10^6) wurden mit ^{125}J-markierten Hitzeaggregaten (10 µl) verschiedener S-Konstanten inkubiert (10, 30 und 60 min bei 0° C und 37° C). Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt.

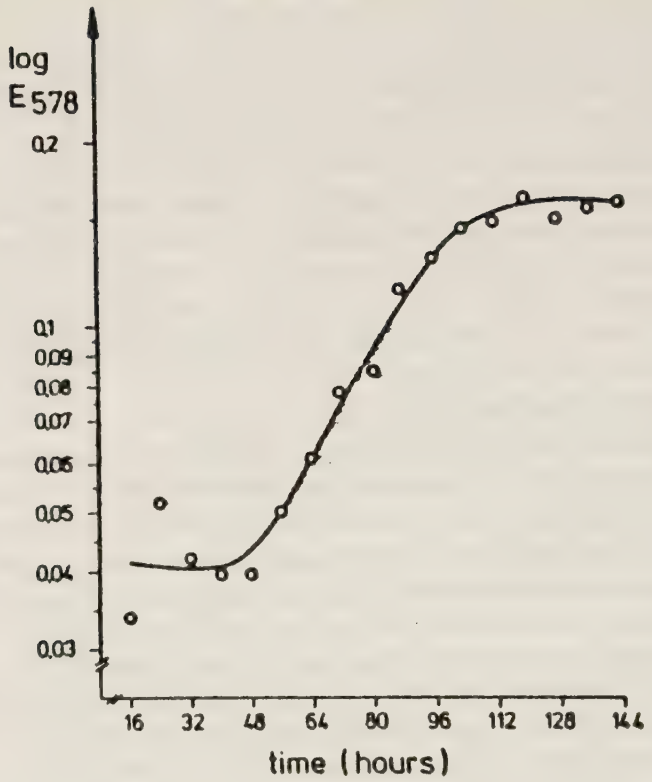

Abb. 10: Wachstumskurve von RBL-Zellen in RPMI 1640. Die Viabilitätsrate wurde durch Färbung mit Trypanblau bestimmt.

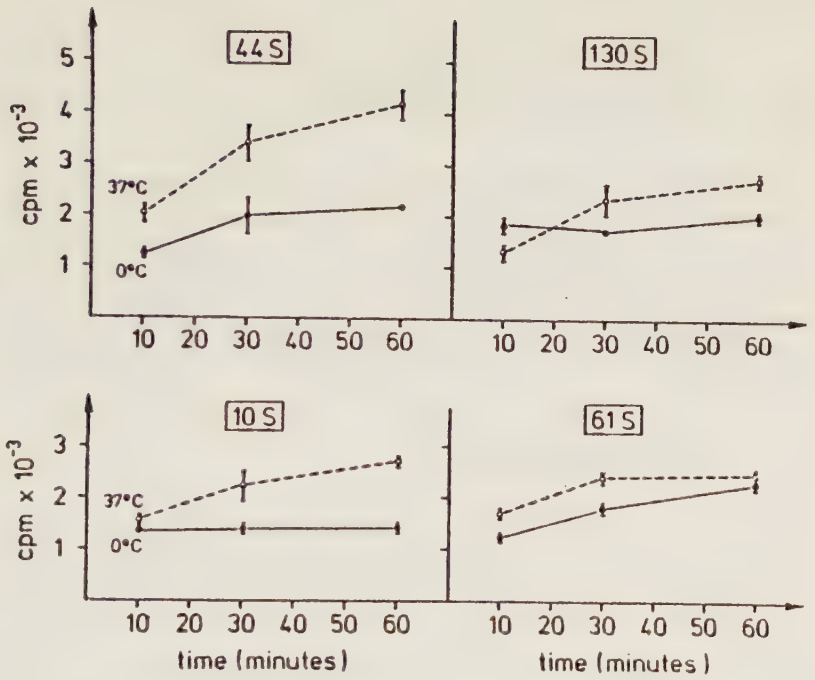

Abb. 11: Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Bindung von h.a.IgGa verschiedener Sedimentationskoeffizienten (10, 44, 61 und 130 S). RBL-Zellen (5 x 10^6 in 100 µl) wurden 10, 30 und 60 min mit ^{125}J-h.a.IgGa bei 0° C und 37° C inkubiert und durch 12 %-iges Ficoll geschleudert. Die Radioaktivität des Zellpellets wurde gezählt.

Wie ersichtlich, verläuft die Bindung in Abhängigkeit von beiden Parametern, d. h. die Effizienz der Bindung steigt mit der Inkubationszeit und ist bei 37° C im Vergleich zu 0° C erhöht. Bei den beiden kleineren Aggregaten (10 und 44 S) tritt der Einfluß der Temperatur etwas deutlicher hervor als bei den beiden größeren (61 und 130 S), jedoch ist er auch hier signifikant.

Das Bindungsverhalten des IgGa ähnelt in diesem Punkt dem Verhalten des IgE, dessen Bindung an seinen Rezeptor, wie von Kulczycki, Isersky und Metzger (1974) gezeigt werden konnte, ebenfalls temperaturabhängig verläuft. Im Unterschied zum IgGa bindet sich das IgE jedoch schneller, was darauf hindeutet, daß seine Affinität zum Rezeptor vergleichsweise höher ist.

D.II.2. Der Einfluß des pH

Durch die im folgenden geschilderten Experimente konnte gezeigt werden, daß die Bindungsaffinität des h.a.IgGa zum Fc-γ-Rezeptor stark vom pH des Inkubationsmilieus beeinflußt wird.

Zu Beginn des Versuchs wurden RBL- bzw. Mastzellen in TACM-Puffer gewaschen und in 3 ml desselben Puffers resuspendiert. Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Viabilitätsrate wurden die Zellen in 3 Aliquote aufgeteilt (je 1 ml) und in TACM-Puffer (je 50 ml) mit verschiedenem pH gewaschen (pH 5.5, 6.4, 7.4 und 8.4). Anschließend wurden die Zellen resuspendiert (5×10^7/ml) und im Versuch eingesetzt.

Nach Inkubation von RBL-Zellen (5×10^6 in 100 µl) bzw. Mastzellen (5×10^5 in 100 µl) mit h.a.IgGa (10 µl) für 1 St. bei 37° C zeigte sich, daß die Bindungskapazität im sauren Bereich erheblich zunimmt, während sie umgekehrt im alkalischen Milieu stark abnimmt (Abb. 12).

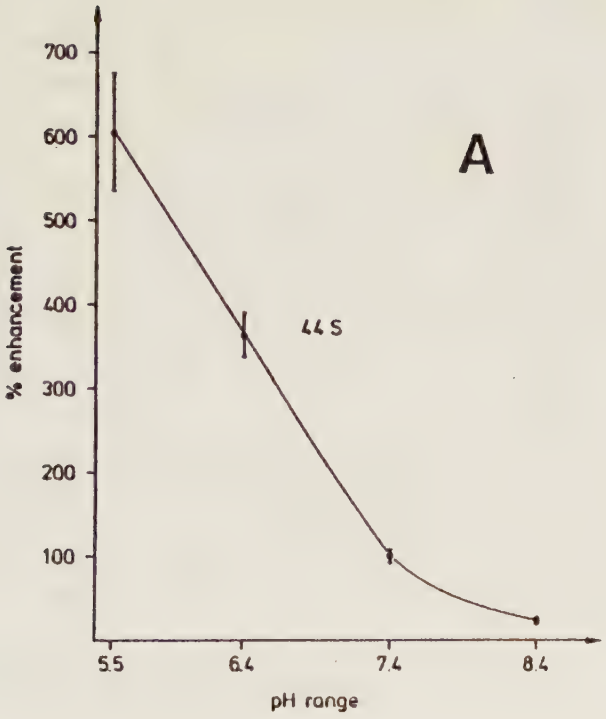

Abb. 12 A: pH-Abhängigkeit der Bindung von h.a.IgGa (44 S) an (A) RBL-Zellen und (B) Mastzellen. Die Bindungsrate bei pH 7.4 diente als Kontrolle (100 %).

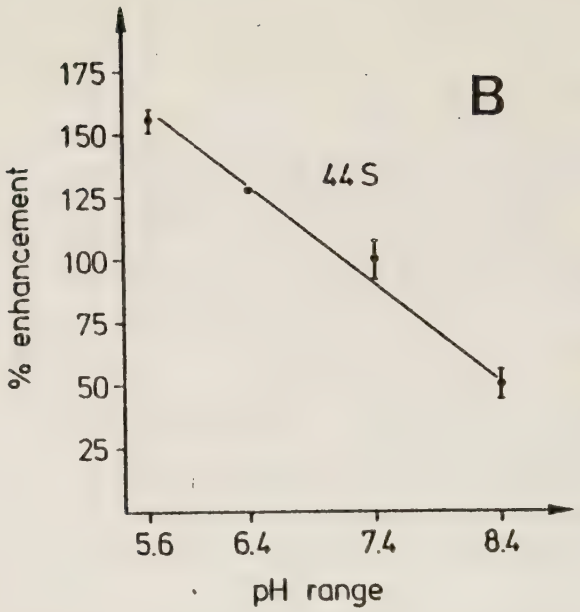

Abb. 12 B: pH-Abhängigkeit der Bindung von h.a.IgGa (44 S) an Mastzellen (siehe vorige Seite).

Verglichen mit der Bindungsrate bei pH 7.4 (100 %) beträgt die Steigerung bei Verwendung des hier dargestellten 44 S Aggregats bei pH 5.5 ca. 500 % bei RBL- und ca. 60 % bei Mastzellen. Im alkalischen Milieu (pH 8.4) ist die Bindungseffizienz um ca. 75 % (RBL-Zellen) bzw. 50 % (Mastzellen) erniedrigt.

Die Viabilität der Zellen hatte sich nach der Inkubationszeit nicht verändert (Färbung mit Trypanblau).

Da die Möglichkeit bestand, daß die veränderten pH-Bedingungen die Größe der Hitzeaggregate verändert hatten, wurden entsprechende Kontrollen durchgeführt. Hitzeaggregiertes IgGa wurde im Sucrose-Dichtegradienten (10 - 40 %) unter den beschriebenen Bedingungen zentrifugiert (siehe C.II.6.). Wie aus Abb. 13 hervorgeht, war die Sedimentationskonstante unter den gewählten Bedingungen die gleiche geblieben.

Bezüglich der Identität bzw. Nichtidentität von Fc-ε - und Fc-γ-Rezeptor ist in diesem Zusammenhang das Verhalten des IgE-Antikörpers von besonderem Interesse. Ein Vergleich des Bindungsverhaltens von IgE und IgGa (130 S Aggregat) bei wechselndem pH an RBL-Zellen führte zu eindeutigen Unterschieden (Abb. 14). Während die Bindungsrate des IgE sowohl im sauren wie auch im alkalischen Bereich (pH 6.4 und 8.4) keine Änderung zeigte, war die Bindung des IgGa-Aggregats im Vergleich zur Bindung bei pH 7.4 im sauren Bereich (pH 6.4) um das 5 - 6-fache erhöht und im alkalischen Bereich um ca. 30 % erniedrigt.

Da eine Veränderung der Zellviabilität und des Molekulargewichts der Aggregate unter diesen Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden konnte, kommen neben Veränderungen der Ladung des IgGa-Moleküls bzw. des Rezeptors mit beträchtlichen Folgen für die Affinität tiefgreifende Änderungen der Membranmobilität in Betracht, die zu einer Vergrößerung der Rezeptorenzahl führen könnten. Ob eine dieser Möglichkeiten zutrifft, kann aufgrund der durchgeführten Versuche nicht entschieden werden.

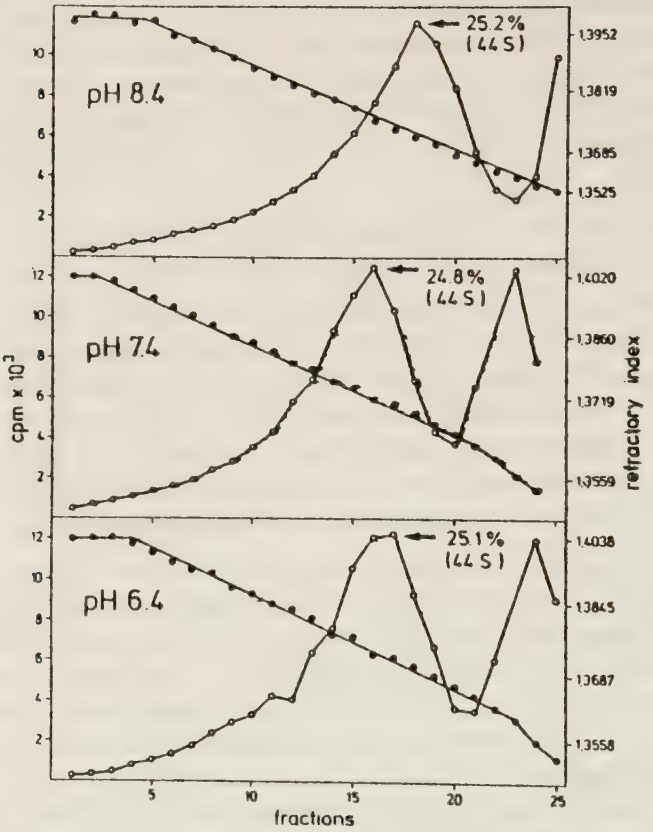

Abb. 13: Rezentrifugation eines 44 S Hitzeaggregats in Sucrose-Dichtegradienten (10 - 40 %, w/v) mit verschiedenen pH-Werten. Die Zentrifugationszeit betrug 5 St. (280.000 g, 5° C).

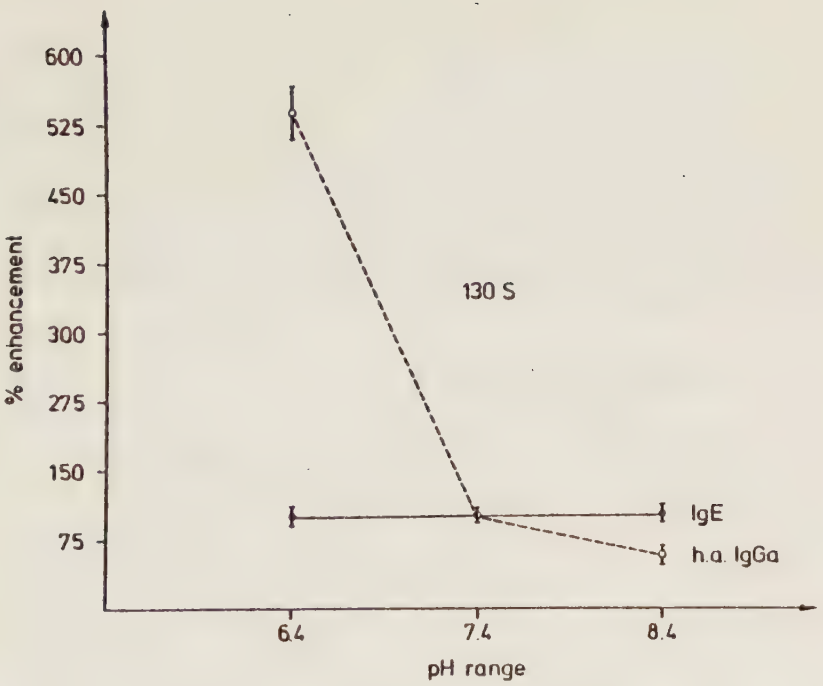

Abb. 14: Vergleich des Bindungsverhaltens von ^{125}J-h.a.IgGa (130 S) und ^{125}J-IgE bei verschiedenem pH.

D.II.3. Die Rolle von Ca^{++}-Ionen

Die Interaktion von IgGa mit seinem Rezeptor wird von der Ca^{++}-Ionen-Konzentration beeinflußt.

RBL-Zellen wurden in Tris-Albumin-Puffer mit verschiedenen Ca^{++}-Konzentrationen gewaschen. Inkubation der Zellen (5×10^6 in 100 µl) mit h.a.IgGa (130 S, 10 µl) bzw. IgE (10 µl) führte nach einer Stunde (37° C) zu einer Erhöhung der Bindungskapazität für IgGa von 35 % bei einer Ca^{++}-Konzentration von 0.3 mM, während die Kapazität der IgE-Bindung nur leicht verändert war (Abb. 15). Die Bindungsrate, die in Ca^{++}-freiem Medium, d. h. unter Tris-EDTA Bedingungen erzielt worden war, diente als Kontrolle (Nullwert).

D.II.4. Dosis-Wirkungs-Studien

Im folgenden wurde die Abhängigkeit der Bindung von der Aggregatkonzentration untersucht. RBL-Zellen (5×10^6 in 100 µl) wurden mit verschiedenen Konzentrationen eines 130 S Hitzeaggregats bei pH 6.4 und pH 7.4 inkubiert (1 Std., 37° C). Wie aus Abb. 16 A ersichtlich ist, wurden bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen scheinbar mehrere Plateaus erreicht. Mit erhöhter Aggregatkonzentration wurde mehr h.a.IgGa gebunden, wobei der höchste Wert 18 % der eingesetzten Radioaktivität erreicht. Eine Absättigung der Rezeptoren konnte hier nicht erzielt werden.

Verglichen damit zeigte die Bindungskurve bei pH 6.4 ein völlig anderes Bild. Abb. 16 B zeigt einen Kurvenverlauf, der aus einer linearen Anstiegsphase in ein Sättigungsplateau führt. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Annahme, daß mit steigender Ligandenkonzentration bei pH 7.4 mehr Rezeptoren verfügbar gemacht werden, während sie bei pH 6.4 von vornherein vorhanden sind.

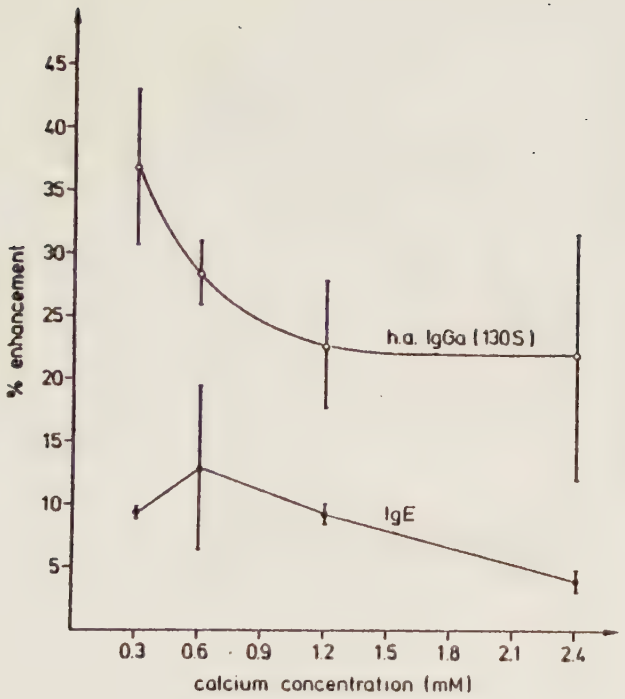

Abb. 15: Der Einfluß von Calcium auf die Bindung von h.a.IgGa und IgE. Die Bindungsrate in Calciumfreiem Milieu (TEDTA) diente als Bezugswert (o).

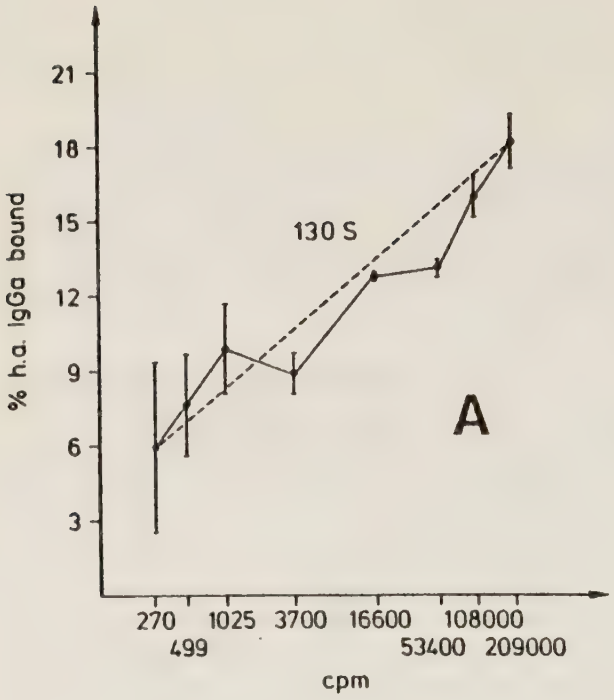

Abb. 16 A: Dosis-Wirkungskurve von h.a.IgGa bei pH 7.4 (A) und pH 6.4 (B). Die gestrichelte Linie stellt die ideale Verbindung zwischen den Endpunkten der Kurve dar. Auf der Abszisse ist die Menge des eingesetzten h.a.IgGa (cpm) aufgetragen, auf der Ordinate der Prozentsatz der gebundenen Aggregate.

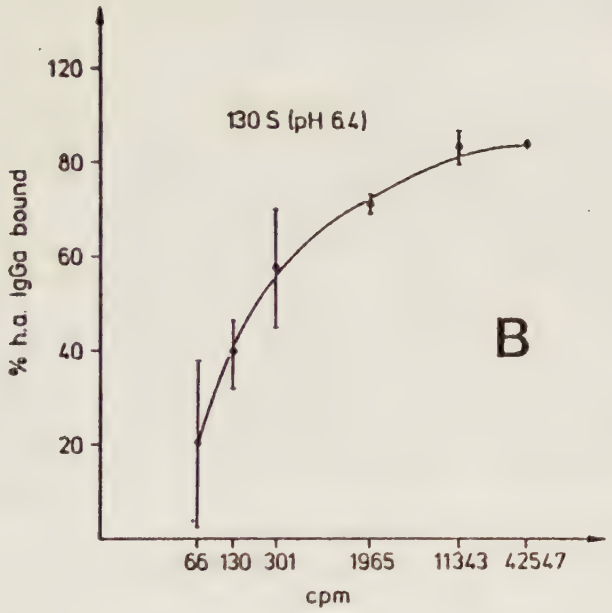

Abb. 16 B: Dosis-Wirkungskurve von h.a.IgGa bei pH 6.4.
Legende siehe vorige Seite.

In Tabelle 2 sind die Bindungsraten aller 4 verwendeten Hitzeaggregate bei pH 7.4 zusammengestellt. Es ist klar ersichtlich, daß die Affinität und Bindungseffizienz in direkter Abhängigkeit von der Zahl der verfügbaren Fc-Stücke steht, d. h. je mehr Fc-Stücke innerhalb eines Aggregats gleichzeitig an die Membran binden können, desto fester und effektiver wird die Bindung.

h.a.IgGa	
S-Rate	% Bindung
10	3.75
44	8.2
61	10.68
130	18.08

Tabelle 2: Beziehung zwischen der Größe der Aggregatmoleküle und der Höhe der Bindungsrate.

D.II.5. Kompetitionsexperimente

Für die Inhibition der Bindung von ^{125}J-h.a.IgGa wurden nicht radioaktiv markierte Aggregate undefinierter Größe verwendet. Die Dosis-Wirkung Studien des letzten Abschnitts legten bereits die Vermutung nahe, daß die Zahl der auf der Zelloberfläche verfügbaren Rezeptoren eine Funktion der

Ligandenkonzentration ist. Dieses dynamische Bild der Zellmembran wurde unterstützt durch die Beobachtung, daß ein saures Milieu (pH 6.4) vermutlich die Zahl der Bindungsstellen variiert. Es ist also zu erwarten, daß der Versuch, die Bindung von ^{125}J-h.a.IgGa mit einem Überschuß an nicht markierten Aggregaten zu inhibieren, nicht unbedingt zum Erfolg führen muß.

Verschiedene Mengen unmarkierter, hinsichtlich ihrer Größe nicht näher definierter Aggregate (0.9 - 90 µg in 20 µl) und konstante Mengen eines definierten ^{125}J-Aggregats (44 S) wurden mit RBL-Zellen (5 x 10^6 in 100 µl) inkubiert (1 St., 37° C). In Spalte A (Tabelle 3) ergab sich mit der niedrigsten Aggregatkonzentration (0.9 µg) eine Erhöhung der Bindungsrate um 54.1 %; als Kontrolle dienten Zellen und radioaktive Aggregate allein.

In Spalte B kam es beim Angebot einer hohen Aggregatkonzentration (90 µg) zu einer Inhibition der ^{125}J-h.a.IgGa-Bindung um 28.3 %; bei niedrigen Konzentrationen zu leichter Erhöhung (13.2 %).

D.II.5.1. Wechselwirkung von h.a.IgGa und ^{125}J-IgE

Die zentrale Rolle des IgE bei der allergischen Reaktion vom Soforttyp wirft im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit natürlich die Frage auf, ob in irgendeiner Form Wechselbeziehungen zwischen der IgE- und der IgGa-Bindung bestehen. Um diese Frage zu klären, wurde versucht,

a) die Bindung von ^{125}-J-IgE mit h.a.IgGa zu inhibieren und
b) den Einfluß von h.a.IgGa auf gebundenes, zellständiges ^{125}J-IgE zu klären.

ADDITION OF ^{125}J-H.A.IgGa		NON-LABELLED H.A.IgGa	AMOUNT OF COLD / LABELLED (FOLD)	COMPETITION (%)
A	118 ng	-	-	0
	"	90 ug	762	+ 0,4
	"	9 ug	76	+ 33,4
	"	0,9 ug	7,6	+ 54,1
B	4,6 ng	-	-	0
	"	90 ug	20 000	- 28,3
	"	9 ug	2 000	+ 5,6
	"	0,9 ug	200	+ 13,2

Tabelle 3: Modulation der Bindungsrate von ^{125}J-h.a.IgGa (44 S) durch Zugabe unmarkierter Aggregate (undefinierter Größe). ^{125}J-h.a.IgGa wurden in den Konzentrationen 118 ng und 4,6 ng eingesetzt.

RBL-Zellen (2.5×10^6 in 100 µl) wurden mit ^{125}J-IgE (10 µl) in Tyrode-Puffer inkubiert (30 min, 37° C). Dann wurde h.a.IgGa verschiedener Verdünnungen zugegeben (20 µl) und für weitere 30 min inkubiert. Dasselbe Experiment wurde auch umgekehrt durchgeführt, d. h. nach Vorinkubation der Zellen mit h.a.IgGa wurde ^{125}J-IgE zugegeben.

Abb. 17 zeigt die Ergebnisse. Danach führte die Vorinkubation der Zellen mit h.a.IgGa (120 µg, Abb. A) zu einer Inhibition der IgE-Bindung von 50 %, verglichen mit der Kontrolle (Puffer statt h.a.IgGa). Mit einer anderen Aggregatpräparation (gestreifter Balken) ergab sich ein ähnlicher Wert (53 %).

Vorinkubation der Zellen mit ^{125}J-IgE (Abb. B) und anschließender Zugabe von h.a.IgGa bewirkte eine leichte Verminderung der ^{125}J-IgE-Bindung (ca. 22 %) bei hohen Aggregatkonzentrationen (120 µg), aber auch eine Zunahme um etwa denselben Wert bei niedriger Aggregatkonzentrationen (1.2 ng). Mit einer anderen Aggregatpräparation wurde ein höherer Wert erzielt (gestreifter Balken; - 45 %).

Um unspezifische Effekte auszuschließen (Adhäsion der Radioaktivität an der Röhrchenwand usw.), wurde derselbe Versuch an einem anderen Tag wiederholt unter Verwendung von Tyrode-Puffer + 0.5 % BSA. Wie aus Abb. 18 zu ersehen, ist der Kurvenverlauf ähnlich, wenn auch die Kompetionswerte im ganzen niedriger liegen (mit Ausnahme der Bindungssteigerung in Abb. B).

In späteren Versuchen soll geprüft werden, ob die eben geschilderte Interferenz des IgGa mit der IgE-Bindung auch Konsequenzen unter biologischen Gesichtspunkten hat (Histaminsekretion bzw. Ca^{++}-Einstrom).

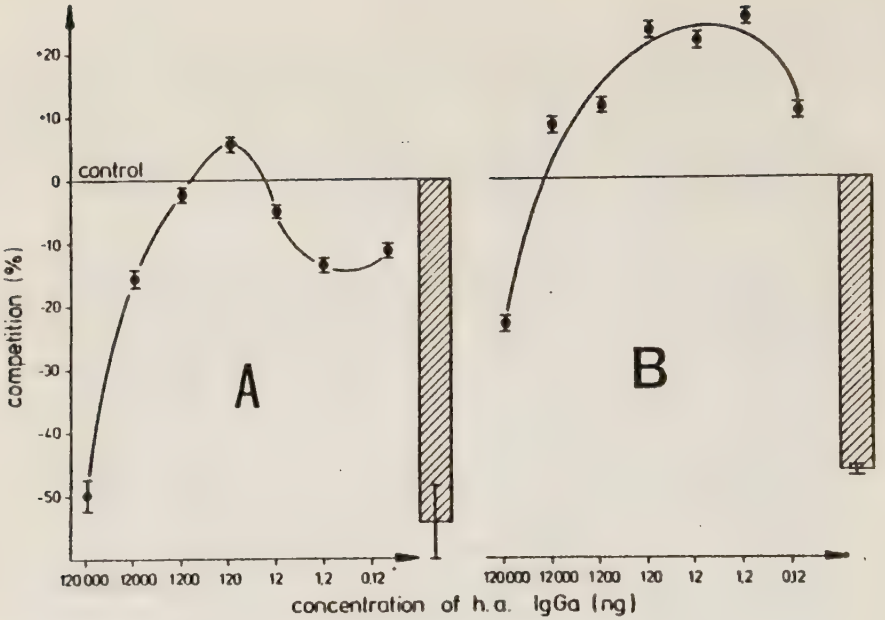

Abb. 17: Modulation der Bindung von ^{125}J-IgE durch Vorinkubation der Zellen mit h.a.IgGa (A) bzw. Vorinkubation mit ^{125}J-IgE und anschließender Zugabe von h.a.IgGa (B). Die gestreiften Balken zeigen die mit einer anderen h.a.IgGa-Präparation (120 µg) erzielten Werte.
Control = Puffer statt h.a.IgGa

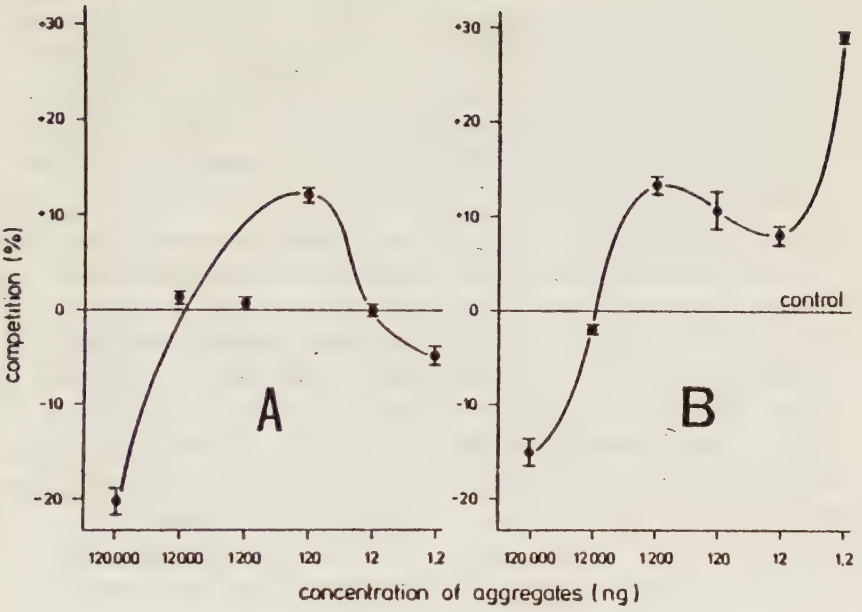

Abb. 18: Modulation der ^{125}J-IgE-Bindung durch Vorinkubation der Zellen mit ^{125}J-IgE und anschließender Zugabe von h.a.IgGa (A) bzw. Vorinkubation mit h.a.IgGa. Die Versuche wurden in BSA-haltigem Puffer (0.5 %) durchgeführt.
Control = Puffer statt h.a.IgGa

D.II.6. Inhibition durch Protein A

Eine partielle Inhibition der IgGa-Bindung kann auch durch Protein A erreicht werden. Vom Protein A, einem Zellwandbestandteil von Staphylococcus aureus, ist bekannt, daß es die Fähigkeit besitzt, sich an das Fc-Stück des IgG der meisten Säugerarten zu binden (Kronval, Seal, Finstad and Williams, 1970). Da die Bindung des IgGa an die Zelle via seinen Fc-Teil erfolgt, können hier durchaus Interferenzen durch Protein A erwartet werden.

Radioaktives h.a.IgGa (150 ng in 100 µl) wurde mit Protein A (100 µg in 20 µl) vorinkubiert (30 min, 0° C). Als Kontrolle dienten Aggregate mit Puffer statt Protein A. RBL-Zellen (5×10^6 in 100 µl) wurden anschließend mit einem Aliquot (10 µl) dieser Mischung inkubiert (1 St., 37° C). Tabelle 4 zeigt für die Hitzeaggregate verschiedener Größe eine Inhibition der Bindung zwischen 13 und 28 %. Eine teilweise Blokkade der Fc-Bindungsstelle durch Protein A hat also stattgefunden.

S-VALUE	INHIBITION (%)
10	27.2
44	13.3
61	15.0
130	16.2

Tabelle 4: Inhibition der Bindung von ^{125}J-h.a.IgGa (10 - 130 S) durch Protein A.

D.II.7. Berechnung der Zahl der gebundenen Moleküle pro Zelle

Die allgemein übliche Methode für die quantitative Berechnung und Darstellung von Liganden-Rezeptor-Interaktion ist die graphische Auftragungsweise nach Scatchard (1949, Rosenthal, 1967). Wegen der schon dargestellten Schwierigkeiten (D.II.4/5) ist eine Berechnung der Bindungsstellen mit Hilfe dieser Methode nicht gelungen. Neben dem Bindungsverhalten der Hitzeaggregate ergab sich noch ein zusätzliches technisches Problem: Um den Grad der unspezifischen Bindung zu ermitteln, wird in der Regel ein Kompetitionsexperiment durchgeführt, in dem versucht wird, mit einem vielfachen Überschuß an nicht markiertem Liganden die spezifische Bindung zu inhibieren. Die verbleibende Bindungsrate muß als unspezifischer Wert von den ermittelten Bindungsdaten subtrahiert werden (Braunsberg und Hammond, 1979). Aufgrund des Herstellungsverfahrens von Hitzeaggregaten definierter Sedimentationskonstanten (Sucrose-Dichtegradienten) ist es jedoch äußerst schwer, ausreichende Mengen eines Aggregats herzustellen.

Deshalb wurde die Berechnung der Bindungsverhältnisse aus den experimentell gewonnenen Daten durchgeführt, d. h. die tatsächlich im Versuch gebundene Molekülzahl pro Zelle wurde ermittelt. Die auf diese Weise berechneten Werte sind in Tabelle 5 dargestellt. Die für die verschiedenen Aggregate angegebenen Molekulargewichte sind tabellarisch ermittelt worden unter der Annahme, daß es sich um sphärische Proteine handelt (Smith, 1970).

Wie ersichtlich, ist die Zahl der gebundenen h.a.IgGa-Moleküle erheblich niedriger als die der zum Vergleich angegebene Zahl der IgE-Moleküle. Lediglich wenn man die Molekül - zahl pro Zelle mit dem angegebenen Molekulargewicht multipliziert, erreicht man Größenordnungen, die mit den Verhältnissen bei der IgE-Bindung vergleichbar sind. Unter sauren pH-Bedingungen (pH 6.4) ist, wie schon gezeigt, die Bindungsrate versechsfacht.

S-VALUE OF AGGREGATES	MOLECULAR WEIGHT	MAXIMAL NUMBER OF MOLECULES/ CELL	MOLECULAR WEIGHT X MAXIMAL NUMBER OF MOLECULES/CELL
10	3×10^5	415	1.25×10^8
44	3×10^6	344	1.03×10^9
61	3.75×10^6	435	1.63×10^9
130	1.3×10^7	461	5.99×10^9
130 (PH 6.4)	1.3×10^7	2741	3.57×10^{10}
* 8 (IgE)	1.9×10^5	5×10^5	9.5×10^{10}

Tabelle 5: Berechnung der pro RBL-Zelle gebundenen h.a.IgGa-Moleküle. Zum Vergleich ist die Zahl der gebundenen IgE-Moleküle pro RBL-Zelle angegeben.

D.III. Bindung definierter Immunkomplexe an RBL-Zellen

Die Anwendung von Hitzeaggregaten für in vitro-Studien physikalischer oder biologischer Art ist zwar einerseits sehr praktisch, stellt aber auf der anderen Seite ein relativ künstliches System dar. Der Einfluß von Hitzeaggregation auf Struktur und Funktion des Immunglobulins ist bisher nicht bekannt. Um Artefakte in dieser Hinsicht auszuschließen, wurden die wichtigsten bisher durchgeführten Versuche mit Immunkomplexen definierter Größe wiederholt und die Ergebnisse verglichen.

Das Immunpräzipitationssystem setzte sich aus HSA und immunelektrophoretisch reinem, antigenspezifischem IgGa-anti-HSA zusammen (siehe Methoden).

Zunächst sollte versucht werden, die Charakteristika der Antigen-Antikörperwechselwirkung analytisch zu erfassen. Im nächsten Schritt wurden auf der Basis der so erzielten Ergebnisse Komplexe definierter Sedimentationskonstanten isoliert. Schließlich wurden mit diesen Komplexen Bindungsstudien durchgeführt.

D.III.1. Analyse löslicher Immunkomplexe im Sucrose-Dichtegradienten

Zur Erstellung einer Präzipitationskurve nach Heidelberger wurden, wie im Methodenteil beschrieben (C.II.11.2), steigende Mengen HSA (1 - 60 µg in 10 µl) mit einer konstanten Menge IgGa-anti-HSA (30 µg in 10 µl) in HBSS-BSA (500 µl) über Nacht (4° C) inkubiert. Als radioaktiver "Tracer" wurde ^{125}J-HSA zugesetzt. Nach Abschleudern und einmaligem Waschen der Präzipitate wurde die Radioaktivität im Gammacounter gemessen.

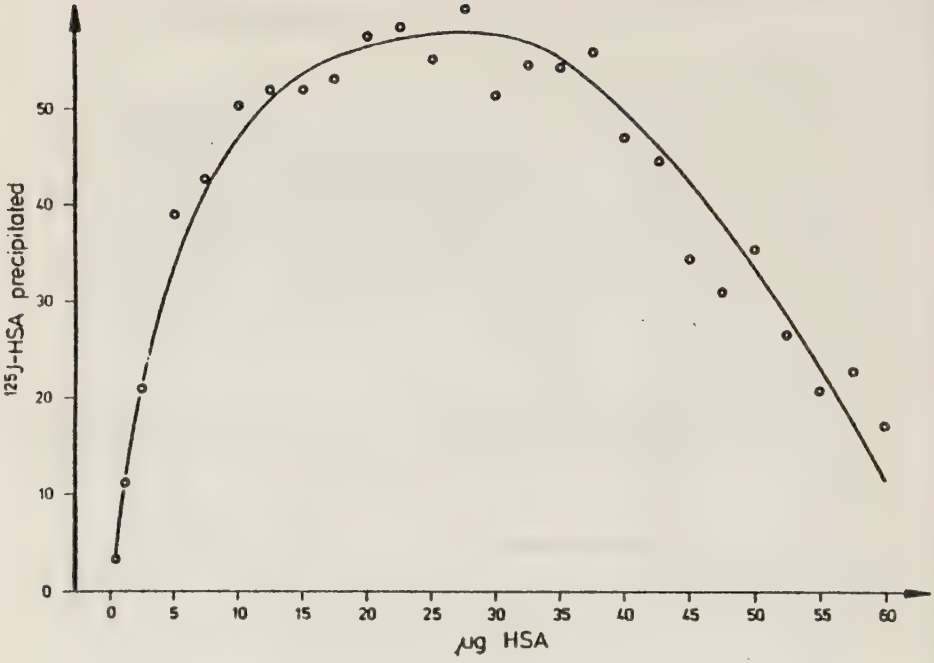

Abb. 19: Präzipitationskurve nach Heidelberger. Steigende Mengen HSA (1 - 60 µg) wurden mit einer konstanten Menge (30 µg) IgGa-anti-HSA inkubiert (über Nacht, 4° C). Die Präzipitate wurden abzentrifugiert, gewaschen und die Radioaktivität gemessen.

Wie in Abb. 19 zu erkennen, lag die Äquivalenzzone der Reaktion zwischen 20 und 30 µg Antigen. Präzipitiert wurden in diesem Bereich bis zu 60 % des angebotenen Albumins. Daß dieser Prozentsatz nicht höher lag, hat seine Ursache vermutlich in der relativ geringen Affinität der Ratten-Antikörper.

Der linke Schenkel der Kurve stellt die Zone des Antikörperüberschusses dar, der rechte die des Antigenüberschusses. Die Überstände der Präzipitate enthalten lösliche Immunkomplexe, deren Größe und Formation abhängig ist von dem ursprünglichen Antigen-Antikörperverhältnis. Für Bindungsversuche interessant sind vor allem die im Antikörperüberschuß gebildeten löslichen Komplexe, die im folgenden näher charakterisiert werden sollen.

Die Überstände von verschiedenen Punkten der Kurve (1, 7.5 und 15 µg HSA) wurden auf Sucrose-Dichtegradienten aufgetragen (10 - 30 % w/v in HBSS-BSA) und zentrifugiert (19 St., 280.000 g). Abnahme und Fraktionierung der Gradienten führten für die verschiedenen Überstände zu den in Abb. 20 dargestellten Mustern.

Ein großer Teil der Radioaktivität war in allen drei Fällen im Pellet des Gradienten lokalisiert. Der Anteil der kleinen Komplexe am Gesamtprotein ist in Abb. 20 A noch sehr klein, nimmt aber immer mehr zu, je mehr sich die analysierten Komplexe der Äquivalenzzone der Präzipitationskurve nähern.

Berechnet man den Sedimentationskoeffizienten der pelletierten Komplexe, so läßt sich der untere Wert mit 30 S angeben, wobei sich allerdings nicht ausschließen läßt, daß die kleinsten im Pellet vorhandenen Komplexe größer als 30 S sind, da diese Berechnung unter der Annahme durchgeführt wurde, daß es sich um eine Zonalzentrifugation handelt. Für isopyknische, d. h. Gleichgewichtszentrifugationen gelten diese Berechnungen nicht.

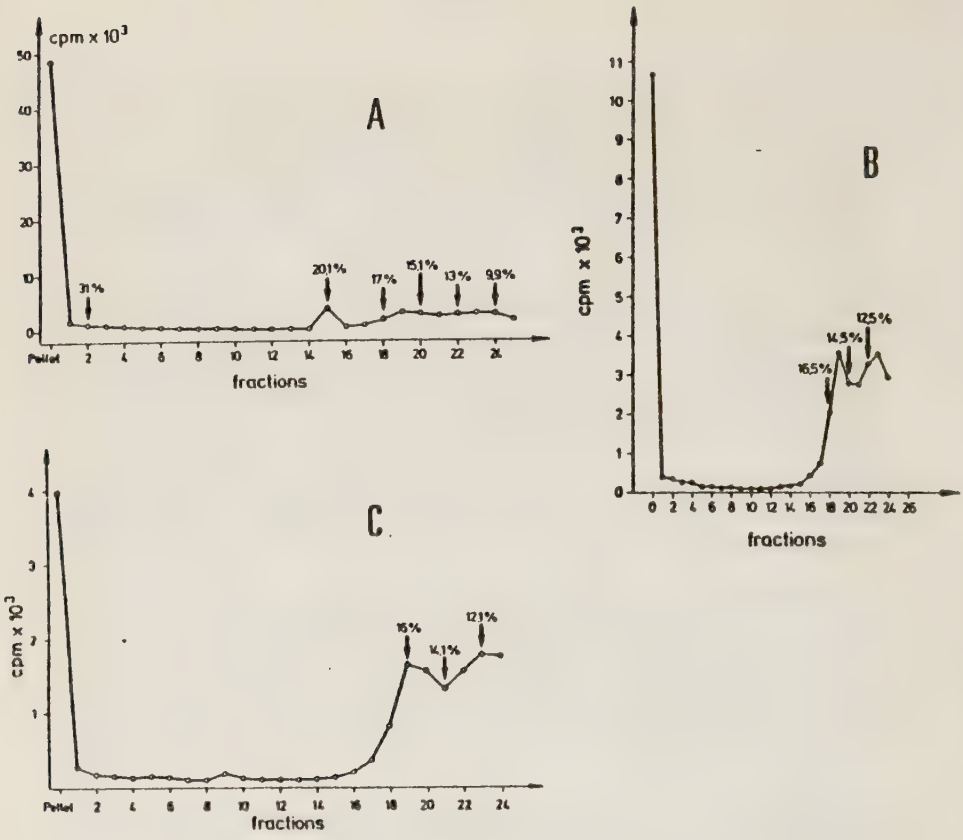

Abb. 20: Isopyknische Dichtegradienten-Zentrifugation (19 St.) von Immunkomplexen der Überstände verschiedener Punkte einer Präzipitationskurve nach Heidelberger (siehe Abb. 19). Die Prozentzahlen geben den Sucrosegehalt der jeweiligen Fraktionen an.

Der obere Wert der Komplexgröße wird die Löslichkeitsgrenze eines Proteins (180 - 200 S) nicht überschreiten, da nur lösliches Protein auf den Gradienten aufgetragen wurde. Im folgenden wurden nur noch die löslichen Überstände von Präzipitaten verwendet, die bei Einsatz von 1 µg HSA entstanden waren. Abb. 21 zeigt das Ergebnis der Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation eines solchen Überstandes. Die Zentrifugationszeit betrug 3.5 St. bei 280.000 g (5° C). Die durch Pfeile bezeichneten Prozentzahlen geben den Sucrosegehalt der jeweiligen Fraktion an. Die Größe der in diesem Bereich aufgetrennten Komplexe beträgt zwischen 39 S (14.9 % Sucrose) und 140 S (25.6 % Sucrose). Die größten, in diesem Gradient erfaßbaren, löslichen Komplexe, die bei einem Sucrosegehalt von 30 % bandieren, haben eine Sedimentationskonstante von 170 S (Fraktion 1).

D.III.2. Isolierung von Immunkomplexen definierter Größe

Immunkomplexe definierter Größe wurden wie folgt isoliert: Je zwei nebeneinanderliegende Fraktionen eines Sucrose-Dichtegradienten wurden zusammengegeben und gegen HBSS-BSA (1 l) dialysiert (2.5 St.), um die Sucrose zu entfernen. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß die in den Fraktionen enthaltene Sucrose mit der Bindung der Komplexe an RBL-Zellen interferiert. Ein Aliquot der so isolierten Komplexe wurde im Sucrose-Dichtegradienten rezentrifugiert. Ergebnisse einer solchen Rezentrifugation sind in Abb. 22 dargestellt. Die hier gezeigten Immunkomplexe waren aus den in Abb. 21 mit Pfeilen versehenen Fraktionen isoliert worden und haben während der Dialyse und Zentrifugation ihre Größe offensichtlich nicht verändert.

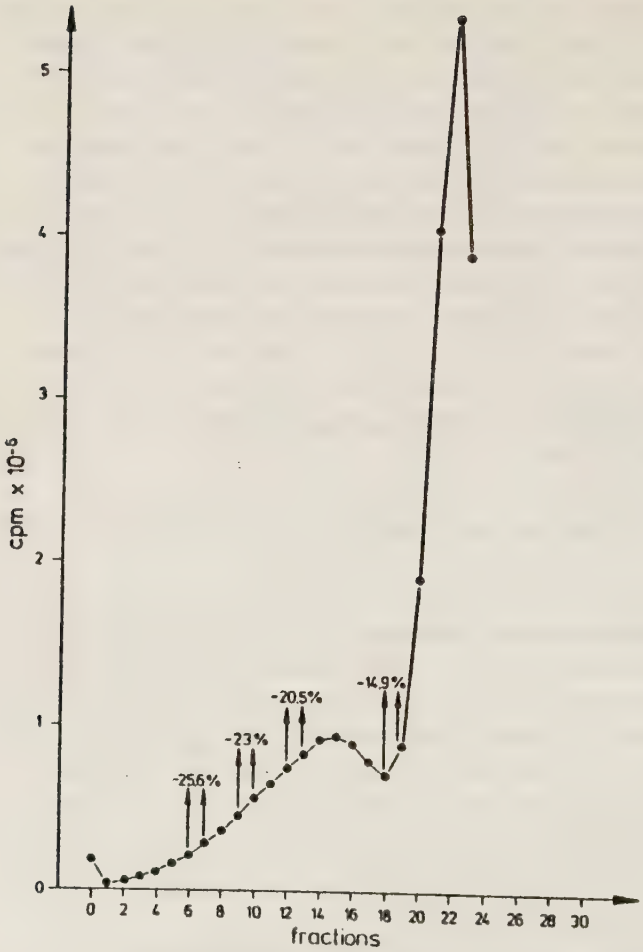

Abb. 21: Zentrifugation von Immunkomplexen im Sucrose-Dichtegradienten (10 - 30 %, w/v; 3.5 St., 280.000 g). Die Komplexe wurden bei einem molaren Verhältnis von 12:1 (Antikörper: Antigen) gebildet. Vor der Auftragung auf den Gradienten wurden die unlöslichen Komplexe durch Zentrifugation entfernt. Die Prozentzahlen geben den Sucrosegehalt der jeweiligen Fraktionen an und entsprechen Sedimentationskonstanten von 140 (25.6 %), 111 (23 %), 88 (20.5 %) und 39 S (14.9 %).

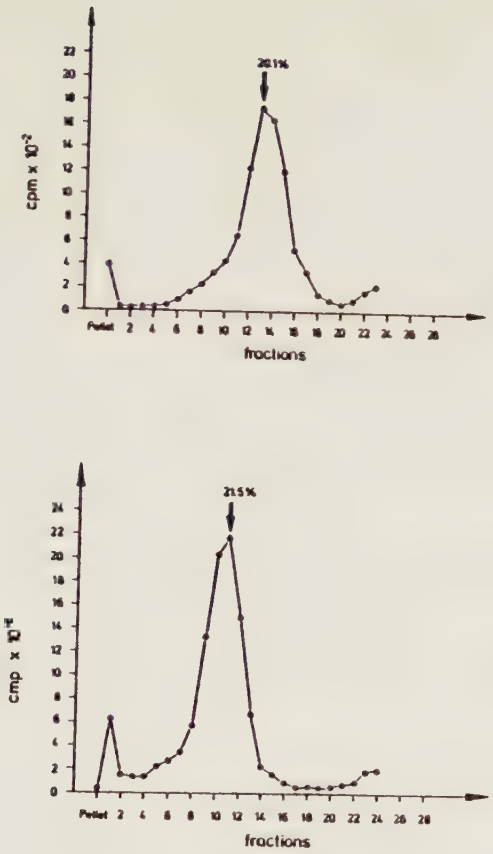

Abb. 22: Rezentrifugation isolierter Immunkomplexe auf Sucrose-Dichtegradienten (10 - 30 %, w/v). Die Peak-Fraktionen (20.1 %, 21.5 %, 23.9 %, 14.9 %) entsprechen 85 S, 98 S, 111 S und 38 S.

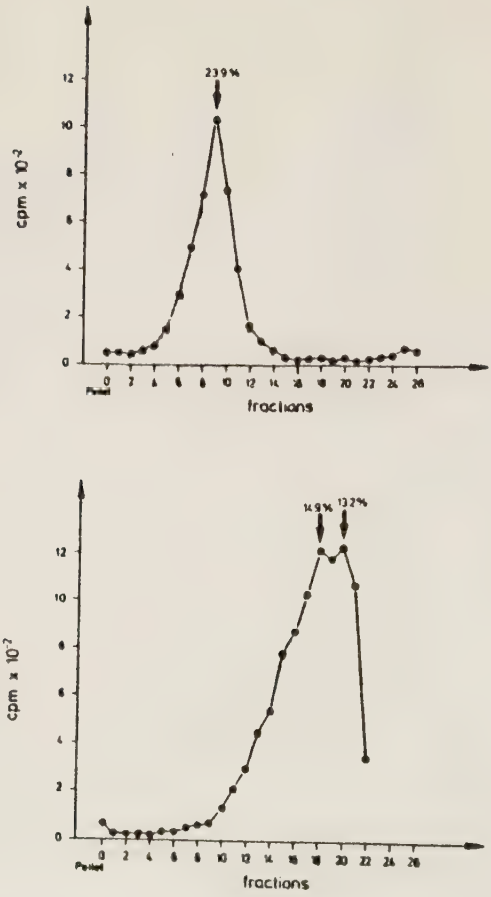

Abb. 22: Legende siehe vorige Seite

D.III.3. Bindungsstudien mit definierten Immunkomplexen an RBL-Zellen

Die relative Instabilität von Immunkomplexen macht es unmöglich, sie nach der Isolierung aus dem Sucrose-Dichtegradienten mit ^{125}J zu markieren, da dieser Arbeitsschritt so langwierig ist (1 - 2 Tage Dialyse). Im Gegensatz zur Arbeit mit Hitzeaggregaten wirft dieses Verhalten der Komplexe einige Schwierigkeiten auf. Das Antigen (HSA) muß mit großen Mengen ^{125}J markiert werden, um hohe spezifische Aktivitäten zu erzielen. Schon bei der Komplexformation mit dem Antikörper wird viel Radioaktivität eingesetzt, damit nach dem letzten Präparationsschritt noch Versuche möglich sind.

IgGa-anti-HSA und ^{125}J-HSA (14 µCi/µg Protein) wurden in einem molaren Verhältnis von 12:1 gemischt. Die Gesamtmenge der eingesetzten Radioaktivität betrug 28 µCi. Nach der Dialyse wurden die isolierten Komplexe sofort für Bindungsstudien verwendet.

D.III.3.1. Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Bindung

RBL-Zellen (1×10^7 in 40 µl) wurden mit Immunkomplexen (100 µl) in HBSS-BSA inkubiert (10, 30 und 60 min bei 0° C und 37° C). Nach Zentrifugation über Ficoll wurde die zellgebundene Radioaktivität bestimmt.

Wie in Abb. 23 für einen 11S-Immunkomplex gezeigt wird, ist die Bindung an RBL-Zellen abhängig von Zeit und Temperatur. Die Komplexe unterscheiden sich in diesem Punkt nicht von den Hitzeaggregaten.

D.III.3.2. Der Einfluß des pH

Im folgenden wurde die Interaktion von Immunkomplexen mit RBL-Zellen unter verschiedenen pH-Bedingungen untersucht. Die Komplexe wurden über Nacht in HBSS-BSA bei pH 7.4 hergestellt. Die Isolierung definierter Komplexe erfolgte dann in Gradienten bei pH 6.4, 7.4 und 8.4.

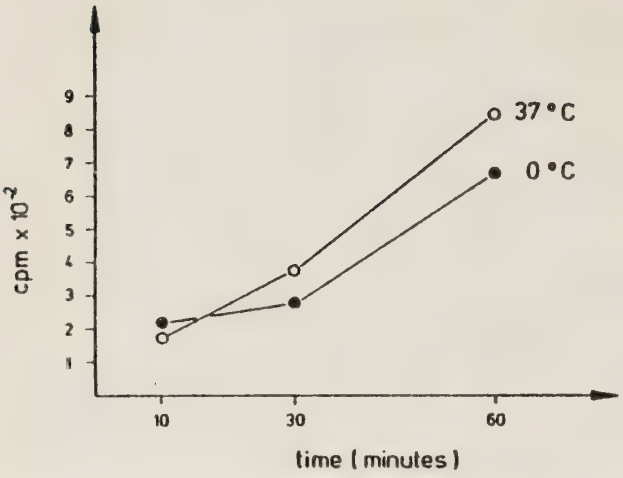

Abb. 23: Temperatur- und Zeitabhängigkeit der Bindung eines 113 S-Immunkomplexes an RBL-Zellen.

Verschiedene Fraktionen wurden gesammelt und gegen HBSS-BSA mit dem jeweiligen korrespondierenden pH-Wert dialysiert. Die Fraktionen mit identischen S-Konstanten wurden für die Bindungsversuche verwendet, nachdem die Radioaktivität auf den gleichen Wert eingestellt worden war.

Die RBL-Zellen wurden in HBSS+BSA gewaschen (pH 7.4), gezählt und dann in 3 Aliquote aufgeteilt, die nochmals in HBSS-BSA (pH 6.4, 7.4 und 8.4) gewaschen wurden.

116 S-Immunkomplexe (100 ul) wurden mit RBL-Zellen (1×10^7 in 100 µl) bei verschiedenem pH inkubiert (1 St., 37° C). Die bei pH 7.4 ermittelte Bindungsrate diente als Kontrolle (100 %).

Abb. 24 zeigt, daß die Bindungsrate sich im sauren Bereich (pH 6.4) mehr als verdoppelte, während sie im alkalischen Bereich (pH 8.4) um ca. 70 % inhibiert wurde. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Bindung von Immunkomplexen durch einen sauren pH begünstigt werden, ebenso wie die Bindung von Hitzeaggregaten, für die eine Steigerung um das zwei-sechsfache gezeigt werden konnte. Wie dort, sind auch hier die Veränderungen im Bindungsverhalten weder durch Verlust der Zellviabilität noch durch Änderungen der Größe der Komplexe zu erklären, wie durch Rezentrifugation gezeigt werden konnte.

D.III.3.3. Studien zur Bindungsaffinität

Immunkomplexe unterschiedlicher Größen (22, 33, 67, 104 und 132 S) wurden wie beschrieben isoliert. Die Radioaktivität aller Fraktionen wurde auf einen Wert eingestellt und anschließend wurden die Komplexe (100 µl) mit RBL-Zellen (1×10^7 in 40 µl) inkubiert (1 St., 37° C).

Abb. 25 zeigt, daß die Bindungsrate eindeutig von der Zahl der verfügbaren Fc-Stücke abhängt. Sie variiert von 8.3 - 20 % für einen 22 bzw. 130 S Immunkomplex. Bei Verwendung

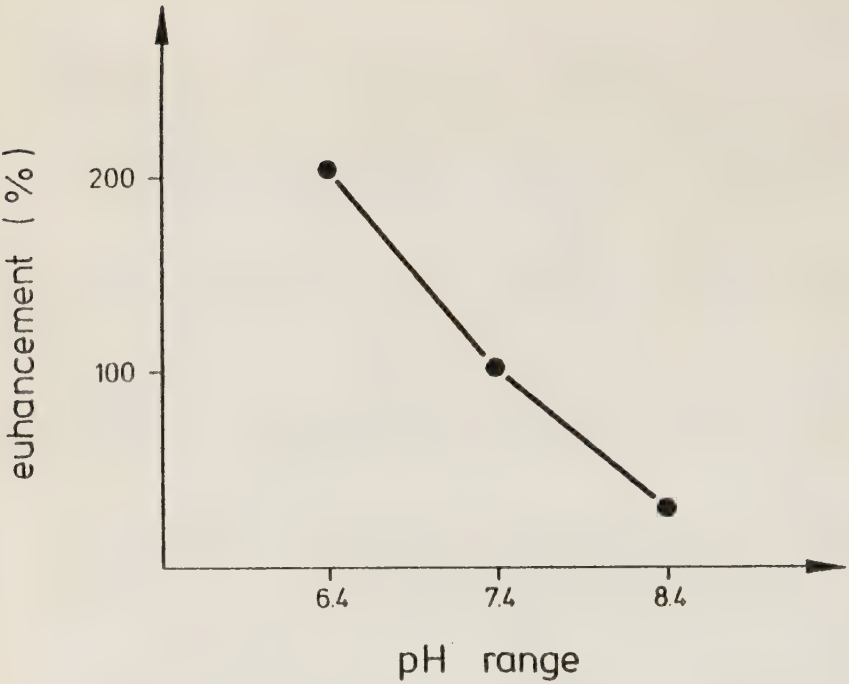

Abb. 24: pH-Abhängigkeit der Bindung von Immunkomplexen (116 S) an RBL-Zellen. Als Kontrolle (100 %) diente die Bindungsrate bei pH 7.4.

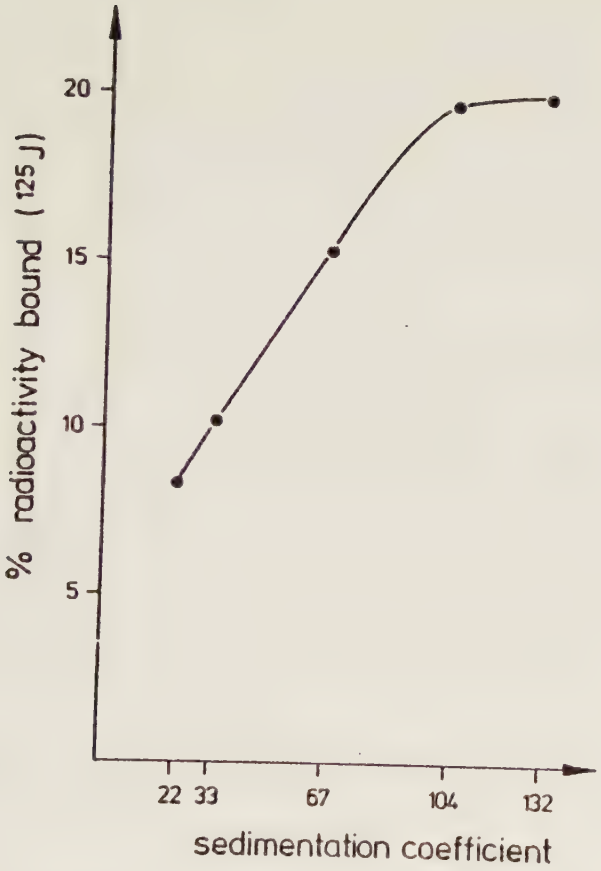

Abb. 25: Analyse der Bindungsrate von Immunkomplexen verschiedener Größe.

von Komplexen mit einer Sedimentationskonstanten von größer als 100 S zeigt die Kurve ein Plateau. Aus den vorliegenden Daten konnte nicht entschieden werden, ob dies eventuell auf eine Größenänderung zurückzuführen ist.

In Tabelle 6 sind die Bindungsraten für Hitzeaggregate und Immunkomplexe einander gegenübergestellt. Die Affinität zum Fc-Rezeptor auf RBL-Zellen ist bei Immunkomplexen signifikant höher als bei Hitzeaggregaten; kleine Komplexe (33 S) weisen bereits höhere Bindungsraten auf als größere Hitzeaggregate (44 S).

IMMUNE COMPLEXES		H.A.IgGa	
S-RATE	% BINDING	S-RATE	% BINDING
22	8.3	10	3.75
33	10.2	44	8.2
67	15.3	61	10.68
104	19.8	130	18.08
132	20.1		

Tabelle 6: Vergleich der Bindungsraten für Immunkomplexe (22 - 132 S) und Hitzeaggregate (10 - 130 S).

D.IV. Untersuchungen zur biologischen Wirksamkeit des IgGa

Wie schon in der Einleitung erwähnt, besteht eine wesentliche Funktion der Mastzelle während der allergischen Reaktion in der Sekretion von Histamin. Im Verlauf der Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp wird die Histaminausschüttung durch die Bindung des korrespondierenden Antigens an die zellständigen IgE-Moleküle vermittelt (Ishizaka und Ishizaka, 1969).

Nun ist von verschiedenen Autoren gezeigt worden, daß der Histaminsekretion ein Einstrom von Ca^{++}-Ionen unmittelbar vorausgeht (Foreman, Hallet und Mongar, 1977; Foreman, Mongar und Gomperts, 1973). Dieser Einstrom ist eine notwendige Bedingung für die Mediatorensekretion, d. h. ohne ihn, z. B. in Gegenwart von TEDTA, findet keine Histaminausschüttung statt.

Nach Nachweis und Charakterisierung der Bindung von h.a.IgGa bzw. IgGa-Immunkomplexen an RBL- und Mastzellen soll in diesem Kapitel der Einfluß des IgGa auf die IgE-vermittelte Histaminsekretion bzw. Ca^{++}-Einstrom untersucht werden. Daneben wird die Wirkung von h.a.IgGa allein auf normale Mastzellen und RBL-Zellen dargestellt werden.

D.IV.1. Modulation des Ca^{++}-Einstroms in RBL- und Mastzellen

Zur Standardisierung der Versuchsbedingungen wurde zunächst die optimale Ca^{++}-Konzentration des Mediums ermittelt. Hierzu wurden RBL-Zellen in Ca^{++}-freiem Tyrode-Puffer gewaschen, in vier Aliquote aufgeteilt und in Tyrode-Puffer (50 ml) mit verschiedenen Ca^{++}-Konzentrationen gewaschen (0, 0.1, 0.3 und 0.5 mM Calcium). RBL-Zellen im jeweiligen Puffer (5×10^6 in 200 µl) wurden mit ^{45}Ca (10 µl) inkubiert (10 min, 37° C). Das Ergebnis ist in Abb. 26 dargestellt.

Mit steigender Ca^{++}-Konzentration nimmt die Menge des in die Zelle eingeströmten ^{45}Ca ab, wobei die Kurve einen asymptotischen Verlauf annimmt. Um Artefakte aufgrund zu niedriger Calcium-Konzentrationen zu verhindern, wurde im folgenden die auch von Foreman, Hallet und Mongar (1977) vorgeschlagene Konzentration von 1 mM Calcium/l verwendet.

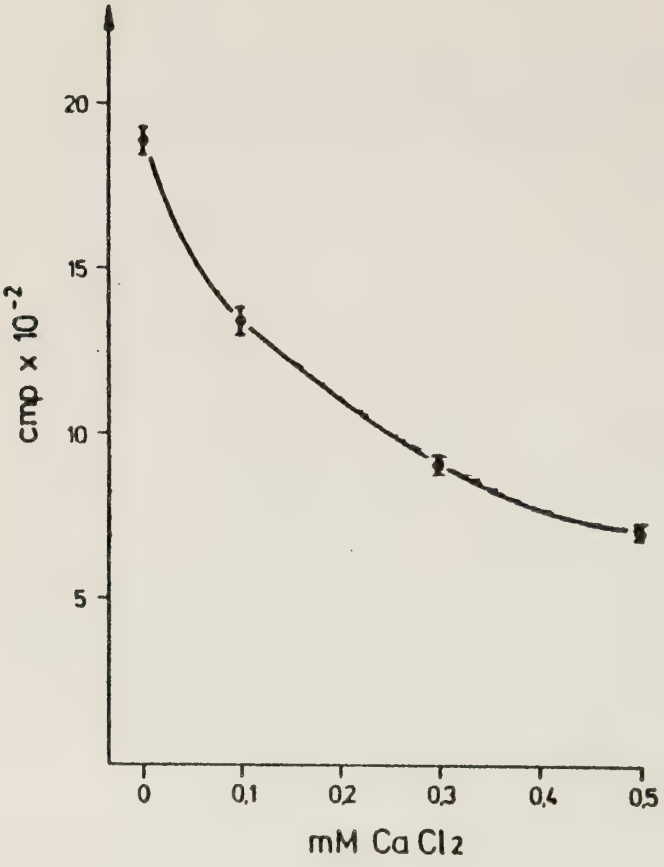

Abb. 26: Abhängigkeit des ^{45}Ca-Einstroms in RBL-Zellen von der Ca^{++}-Konzentration im Medium. Die Zellen (5×10^6 in 200 µl) wurden in Tyrode-Puffer mit verschiedenen Ca^{++}-Konzentrationen (Abszisse) und ^{45}Ca inkubiert (10 min, 37° C).

D.IV.1.1. Kinetik des Einstroms und Modulation durch h.a.IgGa

RBL-Zellen (5×10^6) in Tyrode-Puffer (200 µl) wurden mit h.a.IgGa (150 µg in 20 µl) über verschiedene Zeitintervalle inkubiert (37° C). Wie aus Abb. 27 ersichtlich, war nach 10 min das Maximum des Calcium-Einstroms erreicht, obwohl er, verglichen mit der Kontrolle (Puffer statt h.a.IgGa), leicht inhibiert war. Die nachfolgenden Versuche wurden im folgenden alle über eine Inkubationszeit von 10 min durchgeführt.

D.IV.1.2. Dosis-Wirkungsstudien an normalen Mastzellen und RBL-Zellen

Zur Quantifizierung der eben geschilderten Modulation durch h.a.IgGa wurden RBL-Zellen (5×10^6) bzw. Mastzellen (3.6×10^5) mit verschiedenen Aggregatkonzentrationen (in 20 µl) inkubiert (10 min, 37° C). Abb. 28 zeigt für RBL-Zellen eine eindeutige Abhängigkeit der Inhibition von der h.a.IgGa-Dosis. Bei der höchsten Konzentration (160 µg) betrug die Inhibition 23 % (siehe Legende).

Die Ergebnisse an Mastzellen zeigt Tabelle 7. Auch hier ist eine leichte Inhibition des Calcium-Einstroms zu erkennen, obwohl eine eindeutige Dosis-Abhängigkeit nicht festgestellt werden konnte. Ursache hierfür war wahrscheinlich die im Vergleich zu den RBL-Zellen sehr niedrige verwendete Zellzahl, die zu relativ erhöhten Standardabweichungen führte (bis zu 14 % in Tabelle 7).

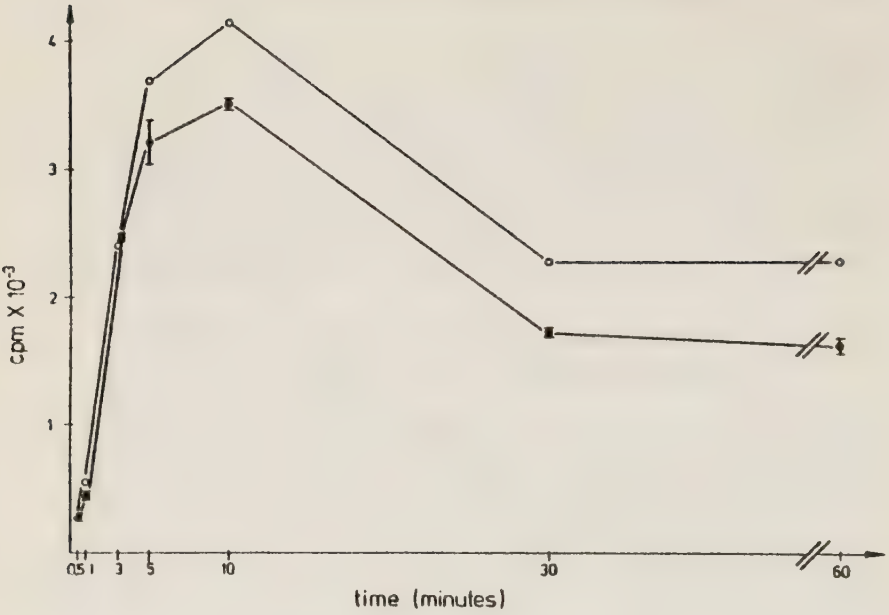

Abb. 27: Kinetik des ^{45}Ca-Einstroms an RBL-Zellen und seine Modulation durch h.a.IgGa.

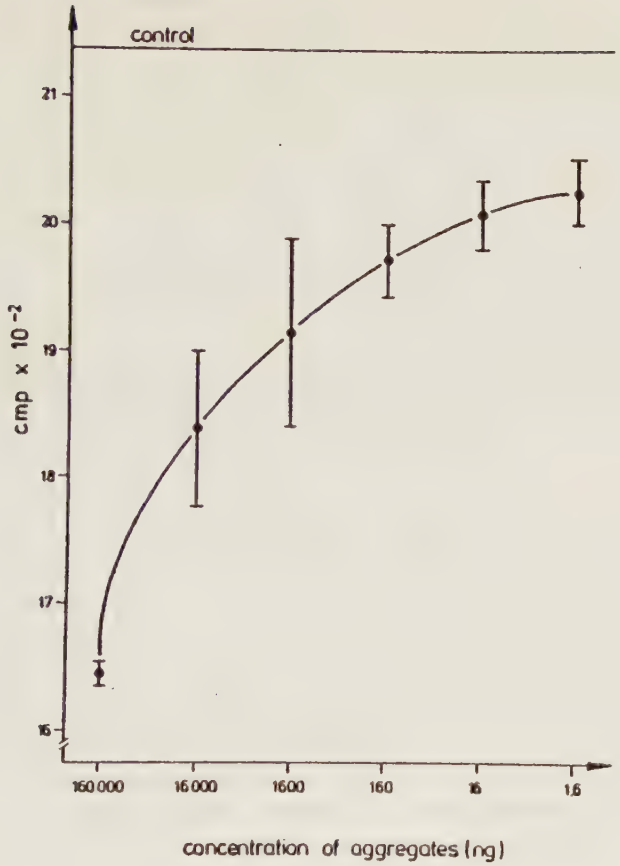

Abb. 28: Dosis-Wirkung von h.a.IgGa auf den ^{45}Ca-Einstrom an RBL-Zellen. Die Kontrolle enthält Puffer statt h.a.IgGa. Bei der höchsten Aggregatkonzentration (160.000 ng) beträgt die Inhibition des ^{45}Ca-Einstroms 23 % (verglichen mit der Kontrolle).

h.a.IgGa (ug)	Inhibition (%)
120	- 6.3
12	- 15.9
1.2	- 19.7
0.12	- 8.8
0.012	- 21.5

Tabelle 7: Inhibition des Ca^{++}-Einstroms in normale Mastzellen. 3.6×10^6 Zellen wurden 10 Minuten bei 37° C mit 20 µl h.a.IgGa inkubiert. Die Inhibition ist in % der Kontrolle (Puffer statt h.a.IgGa) ausgedrückt.

Zu bemerken ist noch, daß bei mehrmaliger Wiederholung dieser Versuche sowohl mit RBL- als auch mit Mastzellen nicht immer eine Inhibition zu sehen war, sondern in einigen Fällen kein Effekt bzw. vereinzelt sogar eine leichte Erhöhung des Calcium-Einstroms auftrat. Wovon das im einzelnen abhing, ist unklar; evtl. spielte der physiologische Zustand der Zellen eine entscheidende Rolle.

D.IV.1.3. Modulation des IgE-mediierten Ca^{++}-Einflusses

Zur Aktivierung IgE-besetzter Mastzellen bzw. RBL-Zellen ist in vivo das korrespondierende Antigen nötig, während in vitro der gleiche Effekt mit einem anti-IgE-Serum erzielt werden kann. Für die hier dargestellten Versuche wurde die IgG-Fraktion eines ε-spezifischen Antiserums benutzt.

Der Grad der Aktivierung ist in diesem Fall abhängig vom Verhältnis der Zahl der auf der Zelle gebundenen IgE-Moleküle und der Zahl der eingesetzten anti-IgE-Moleküle. Aus diesem Grund wurden in einem Versuchsansatz immer zwei bzw. drei anti-IgE-Konzentrationen eingesetzt.

In Abb. 29 ist die Stimulation IgE-besetzter RBL-Zellen dargestellt. Die Zellen (5×10^7) wurden mit IgE-haltigem, reaginem Rattenserum (200 und 500 µl) inkubiert (30 min, 37° C), zweimal in Tyrode gewaschen (10 min, 100 g) und anschließend in 2 ml desselben Puffers resuspendiert. Aliquote dieser Präparation (200 µl) wurden mit anti-IgE (50 µl) verschiedener Konzentrationen unter gleichzeitiger Zugabe von ^{45}Ca inkubiert (10 min, 37° C). Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit reaginem Serum, sondern mit Puffer inkubiert worden waren.

Das Maximum der Aktivierung (siehe Abb. 29) wurde durch Beschichtung der RBL-Zellen mit 50 µl reaginem Serum pro 5×10^6 Zellen und folgender Stimulation durch eine anti-IgE-Verdünnung von 10^{-3} erzielt. Bei dem Versuch, dieses soeben beschriebene Modell der Zellaktivierung als Testsystem für die Untersuchung des h.a.IgGa-Einflusses auf den IgE-anti-IgE-vermittelten Calcium-Einstrom zu verwenden, ergaben sich jedoch Schwierigkeiten, die es letztlich unbrauchbar machten. In einigen Fällen führte die Stimulation der IgE-besetzten Zellen mit dem Antiserum entweder zu gar keinem oder nur sehr mäßigem Erfolg, d. h. die Rate des ^{45}Ca-Einstroms war zu gering, um deutliche Aussagen machen zu können.

Hauptursache hierfür war vermutlich die Qualität des verwendeten reaginen Serums, da das IgE unter Umständen beim Einfrieren oder Auftauen des Serums seine Aktivität verlieren kann.

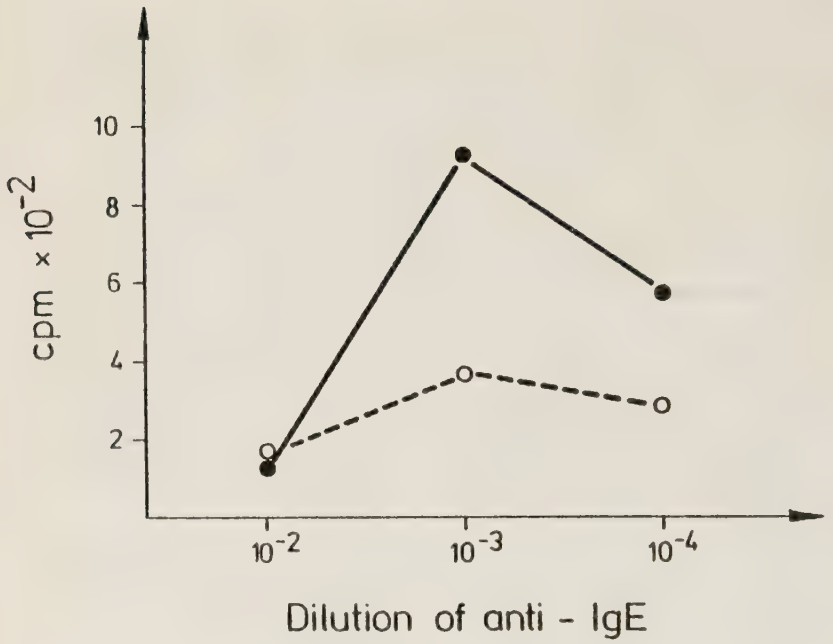

Abb. 29: ^{45}Ca-Einstrom in RBL-Zellen (5 x 10^6 in 200 µl). Die Zellen wurden mit reaginem Rattenserum inkubiert (50 µl =●—●; 20 µl =O--O), gewaschen und anschließend verschiedenen Verdünnungen anti-IgE ausgesetzt (50 µl).

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurden Mastzellen von mit Nip. bras. infizierten Ratten verwendet. Die Zellen wurden 2 - 3 Wochen nach der Infektion bzw. Reinfektion der Tiere gewonnen.

Abb. 30 zeigt die Stimulation einer solchen Mastzellpräparation mit verschiedenen anti-IgE-Verdünnungen in Abhängigkeit von der Zeit. Die Zellen (4×10^5 in 200 µl) wurden mit anti-IgE (50 µl) unter gleichzeitiger Zugabe von ^{45}Ca inkubiert (1,5 und 10 min bei 37° C). Die Kontrollen enthielten Puffer anstelle des anti-IgE. Nach 10 min geht die Kurve - ausgenommen bei Verwendung einer 10^{-4} Antiserumverdünnung - in ein Plateau über und zeigt im übrigen die erwartete Abhängigkeit des Aktivierungsgrades von der Antiserumkonzentration. Die Standardabweichung der dargestellten Werte lag zwischen 3 und 10 %.

Der Zusatz von IgGa zu diesem Versuchsmodell ergab in Abhängigkeit von der Dosis sehr interessante Ergebnisse. Mastzellen (4.2×10^5 in 200 µl) wurden mit verschiedenen Konzentrationen h.a.IgGa (150 µg - 1.5 ng) vorinkubiert (30 min, 37° C), erst dann erfolgte die gleichzeitige Zugabe von anti-IgE und ^{45}Ca. Die Kontrollen enthielten Puffer statt h.a.IgGa.

Abb. 31 zeigt, daß die Konzentration des Antiserums nicht nur die Stimulation der IgE-besetzten Mastzelle bestimmt, sondern auch den Grad der Modulation durch h.a.IgGa. Bei einer anti-IgE-Verdünnung von 10^{-3} betrug der Calcium-Einstrom der Kontrolle das 2.4-fache von demjenigen der 10^{-2}-Verdünnung (in der Zeichnung nicht dargestellt), d. h. die 10^{-3}-Verdünnung war in diesem Versuchsansatz hinsichtlich der Zellaktivierung optimal, die 10^{-2}-Verdünnung suboptimal.

Bei optimaler Stimulation der Zellen bestand die Wirkung der IgGa-Aggregate in einer radikalen Hemmung (90 %) des Calcium-Einstroms, während bei suboptimaler Stimulation die Zugabe von h.a.IgGa je nach Konzentration zu einer Inhibition (hohe Konzentration) oder einer Erhöhung (niedrige Konzentration) führte (50 %).

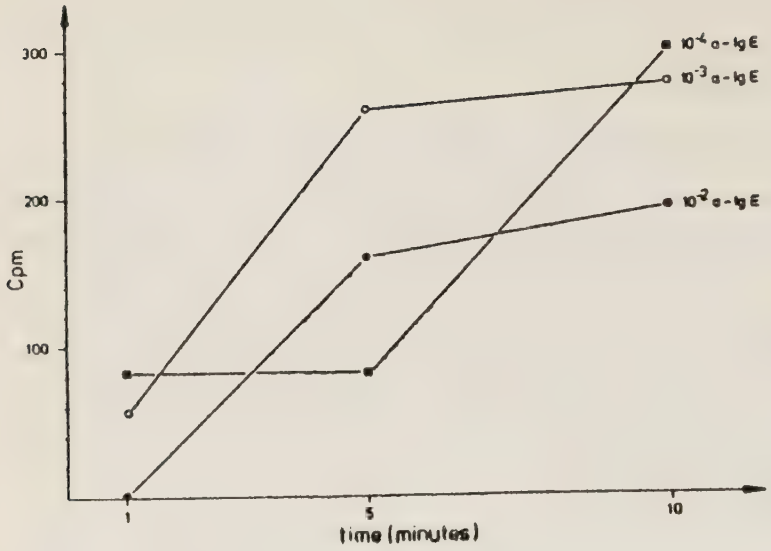

Abb. 30: Abhängigkeit des ^{45}Ca-Einstroms in Mastzellen von Nip. bras. infizierten Ratten (4 x 10^5 in 200 µl) von der Zeit und der anti-IgE-Verdünnung. Die Zellen wurden 10 min mit ^{45}Ca und anti-IgE (50 µl) inkubiert (37° C).

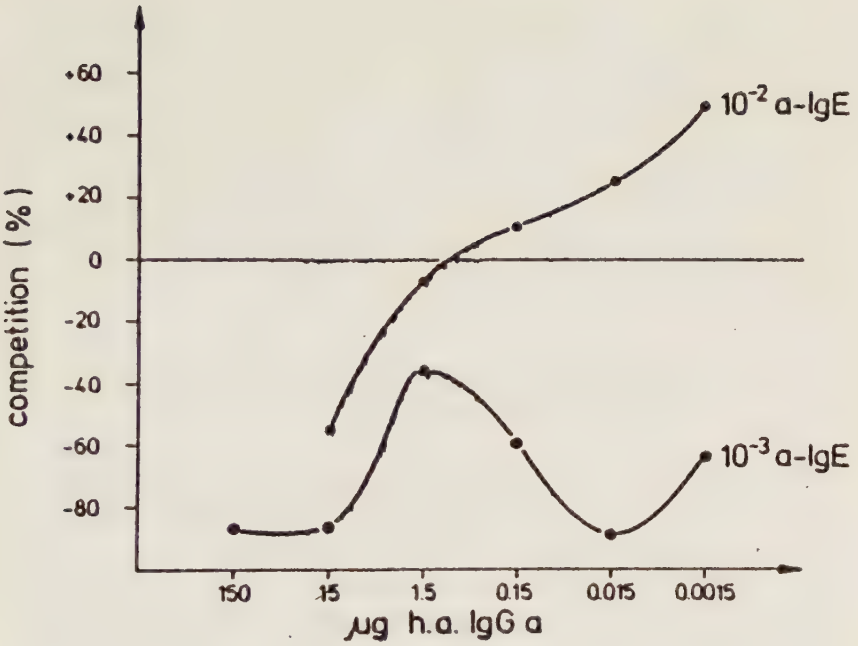

Abb. 31: Modulation des IgE-vermittelten ^{45}Ca-Einstroms in Mastzellen von Nip. bras. infizierten Ratten durch h.a.IgGa. Die Zellen (4.2 x 10^5 in 200 µl) wurden mit h.a.IgGa vorinkubiert (30 min, 37° C), dann wurden ^{45}Ca und anti-IgE (50 µl) zugegeben und nochmals inkubiert (10 min, 37° C).

D.IV.2. Modulation der Histaminsekretion an Mastzellen durch h.a.IgGa

Untersuchungen zur Histaminsekretion wurden ausschließlich an Mastzellen durchgeführt. Der Grund hierfür liegt im geringen Histamingehalt der RBL-Zellen, der nur etwa 3 - 5 % von dem der Mastzellen beträgt. Wie zu Beginn dieses Kapitels dargelegt wurde, besteht eine starke Korrelation zwischen dem Einstrom von Calcium in die Zelle und der Ausschüttung von Histamin. Aus diesem Grund sind bei den in diesem Abschnitt durchgeführten Versuchen prinzipiell ähnliche Ergebnisse zu erwarten wie bei den Calcium-Untersuchungen.

D.IV.2.1. Der Einfluß des IgGa auf die Histaminsekretion an normalen Mastzellen

Mastzellen (2×10^5) wurden in Tyrodepuffer aufgenommen (200 µl) und mit h.a.IgGa verschiedener Konzentrationen (20 µl) inkubiert (1 St., 37° C). Nach Zugabe von 1 ml Puffer wurden die Zellen abgeschleudert (10 min, 100 g), mit dem Überstand wurde eine $HC10_4$-Fällung (2 %) durchgeführt, um Protein zu entfernen. Die Histaminmessung wurde im Autoanalyzer durchgeführt. Als Kontrolle diente die Spontanfreisetzung der Zellen ohne h.a.IgGa. Der Histamingehalt der unter Einwirkung von h.a.IgGa erhaltenen Überstände wurde in % zur Spontanfreisetzung ausgedrückt.

Abb. 32 zeigt, daß der Einfluß des IgGa auf die Sekretionsleistung im wesentlichen in einer Stabilisierung der Mastzelle besteht. Im Bereich von 150 µg - 15 ng h.a.IgGa war die Sekretion gegenüber der Kontrolle leicht vermindert, nur bei der kleinsten Konzentration (1.5 ng) fand eine leichte Erhöhung statt (ca. 8 %). Wie erwartet, unterscheidet sich dieses Ergebnis nicht von Bild des Calcium -Einstroms unter diesen Bedingungen.

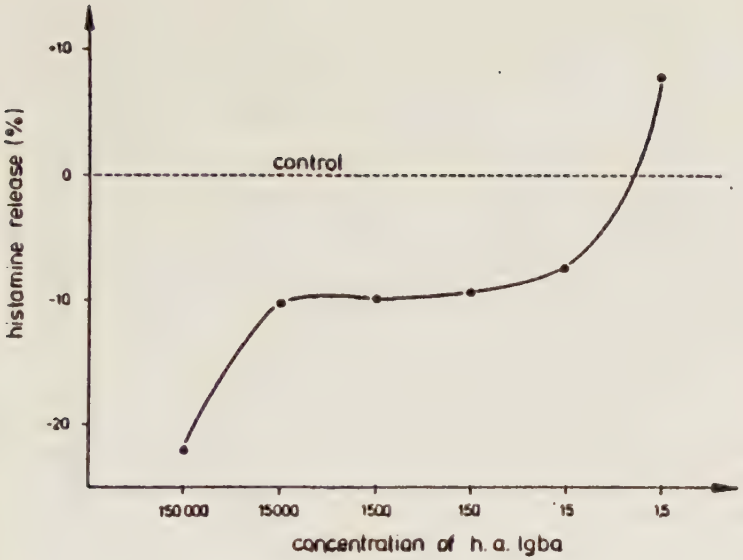

Abb. 32: Modulation der Histaminsekretion aus normalen Mastzellen durch h.a.IgGa. Mastzellen (2 x 10^5 in 200 µl) wurden mit h.a.IgGa (20 µl) inkubiert (1 St., 37° C).

D.IV.2.2. Modulation der IgE-vermittelten Sekretionsleistung

Mastzellen wurden in Tyrode-Puffer (2×10^5 in 200 µl) mit h.a.IgGa verschiedener Konzentrationen (20 µl) inkubiert (30 min, 37° C). Nach Zugabe von anti-IgE verschiedener Verdünnungen (10^{-2}, 10^{-3} und 10^{-4}) wurde nochmals inkubiert (1 St., 37° C). Anschließend wurde 1 ml Puffer zugegeben, die Zellen abgeschleudert und der Histamingehalt des Überstandes wie beschrieben gemessen. Die durch anti-IgE erzielte Histaminfreisetzung wurde ermittelt durch Subtraktion der Spontanfreisetzung von diesem Wert (Spontanfreisetzung = Puffer statt Aggregate und anti-IgE). Die Modulation durch h.a.IgGa wird in % dieses Werts ausgedrückt.

Abb. 33 A, B zeigt die Ergebnisse. In Teil B (anti-IgE-Verdünnung 10^{-2}) konnten bei hoher Aggregatkonzentration (150 µg) 75 % Inhibition der Histaminausschüttung registriert werden, bei niedrigen Konzentrationen (150 - 1.5 ng) ein leichtes Ansteigen (14 %).

Bei anti-IgE-Konzentrationen von 10^{-3} und 10^{-4} (Abb. 33 A) war mit einer Ausnahme (150 µg h.a.IgGa, anti-IgE 10^{-3}) nur eine vielfach erhöhte Histaminsekretion zu beobachten. Zu bemerken ist hierbei allerdings, daß die maximal erreichten Werte, drückt man sie in ng Histaminsekretion pro Ansatz aus, nicht höher liegen als die bei optimaler anti-IgE-Verdünnung erreichen (Abb. 33 B).

Wie schon bezüglich des Calcium-Einstroms festgestellt, zeigt sich hier, daß auch bei der Mediatorensekretion die Wirkung aggregierten IgGa's auf die IgE-vermittelte Sekretionsleistung der Mastzellen von mehreren Faktoren abhängt. Der wesentlichste Faktor scheint die IgGa-Konzentration zu sein, da bei hohen Aggregatkonzentrationen, wenn überhaupt, nur eine schwache Histaminsekretion erfolgte. Daneben hängt das Verhalten der Zelle aber entscheidend davon ab, wie das

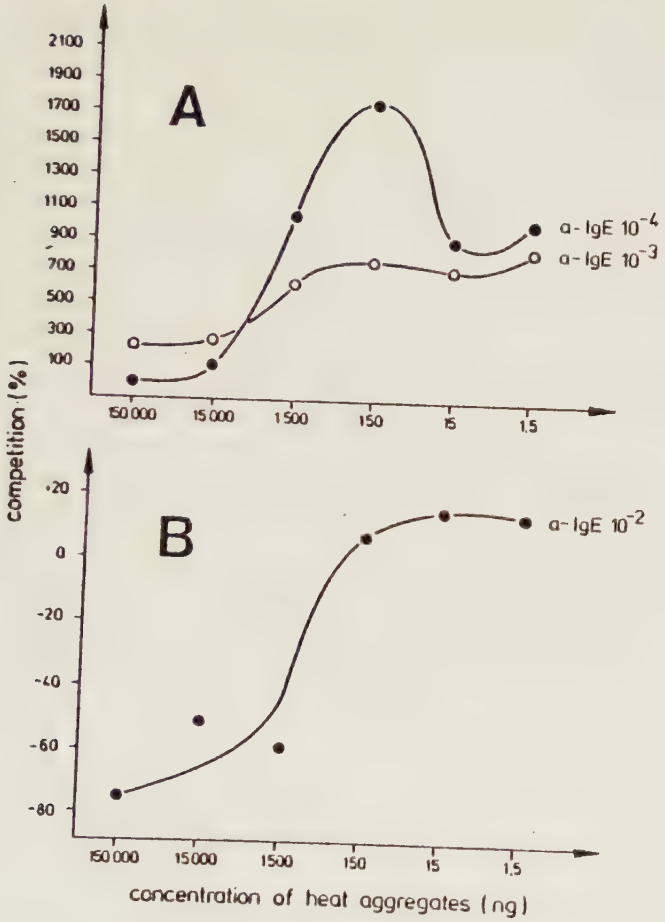

Abb. 33: Modulation der IgE-vermittelten Histaminsekretion aus Mastzellen von Nip. bras. infizierten Ratten. Die Mastzellen wurden mit h.a.IgGa vorinkubiert (30 min, 37° C); anschließend wurde mit anti-IgE (50 µl) inkubiert (1 St., 37° C).

quantitative Verhältnis der Zahl der zellständigen IgE-Moleküle zu der des angebotenen anti-IgE ist. Ist dieses Verhältnis hinsichtlich der Zellaktivierung optimal, dann besteht die Wirkung des IgGa's in einer Hemmung, ist es suboptimal, können sowohl Hemmung als auch Steigerung beobachtet werden.

D.V. Versuche zur Reinigung des Fc-γ-Rezeptors

Im bisherigen Verlauf der Arbeit ist neben der quantitativen und qualitativen Charakterisierung der Interaktion von IgGa mit seinem Rezeptor auch eine Interferenz des zytophilen Antikörpers mit der Bindung des IgE bzw. mit den durch IgE vermittelten biologischen Reaktionen gezeigt worden. Die äußerst interessante Frage nach der Identität von Fc-γ- und Fc-ε-Rezeptor läßt sich eindeutig jedoch aus den bisher dargestellten Ergebnisse nicht beantworten. Obwohl die Analyse der Bindungsparameter von h.a.IgGa, insbesondere das Verhalten bei unterschiedlichem pH und die Fähigkeit, sich auch an IgE-besetzte Zellen zu binden (siehe Rosetten- und Fluoreszenzversuche), eher die Nicht-Identität der beiden Rezeptoren unterstützt, steht der direkte Beweis noch aus. Wie schon erwähnt, ist das Molekulargewicht und die Zusammensetzung des IgE-Rezeptors bekannt. Auf Rattenmastzellen und RBL-Zellen wurde er als ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 50.000 dalton charakterisiert (Kulczycki, Mc Nearney und Parker, 1976), auf menschlichen Basophilen liegt sein Molekulargewicht bei 58.000 dalton (Hempstead, Parker und Kulczycki, 1979). In diesem Kapitel sollen die zur Ermittlung des Molekulargewichts des FC-γ- Rezeptors durchgeführten Versuche dargestellt werden.

D.V.1. Isolation des Rezeptors durch Immunpräzipitation mit h.a.IgGa und anti-IgGa

Für diesen Versuch wurden ausschließlich RBL-Zellen verwendet. Der theoretische Ansatz dieser Methode soll kurz geschildert werden: Durch die Bindung von h.a.IgGa an den Fc-γ-Rezeptor entsteht ein Antikörper-Rezeptorkomplex, den man mit Hilfe eines nicht-ionischen Detergenz aus der Membran lösen kann. Anschließend kann man den Komplex mit einem anti-IgGa-Antikörper präzipitieren und mit analytischen Methoden, z. B. der

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, untersuchen. Wurde die Zellmembran vor der Bindung des IgGa's mit ^{125}J markiert, sollte sich der Rezeptor nach der Elektrophorese autoradiographisch sichtbar machen lassen.

RBL-Zellen (3×10^7) wurden nach einer modifizierten Methode von König und Ishizaka (1976) enzymatisch mit ^{125}J oberflächenmarkiert (1mCi) und fünfmal gewaschen. Nach Resuspension in PBS (1 ml) werden 300 ul der Zellen mit h.a.IgGa undefinierter Größe vermischt (50 µl, 6 mg/ml) und inkubiert (1 St., 37° C). Die Kontrolle enthielt kein h.a.IgGa. Dann wurde NP 40 zugegeben (2 %-ig, 350 µl) und solubilisiert (15 min, 4.000 g) und IgGa bzw. IgGa-Rezeptorkomplexe im Radioimmunoassay mit anti-IgGa präzipitiert. Bis zu 1 % der counts konnten maximal gefällt werden. Das Präzipitat wurde gewaschen (zweimal), in Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgekocht (5 min) und auf ein Gel (10 %-ig) aufgetragen. Das Ergebnis der PAGE war negativ, d. h. nach der autoradiographischen Entwicklung des getrockneten Gels war gegenüber der Kontrolle keine Bande festzustellen, die dem Rezeptor hätte zugeordnet werden können. Dieser Ansatz wurde mehrmals mit dem gleichen Ergebnis wiederholt.

In einem anderen Versuchsansatz wurden nicht-markierte anstelle "heißer" Zellen verwendet. Das hier gewonnene Präzipitat aus IgGa-Rezeptor und anti-IgGa wurde, emulgiert in Freund's Adjuvans, in die Fußsohlen von Meerschweinchen gespritzt. Die Tiere erhielten nach 14 Tagen eine "Booster"-Injektion und wurden nach weiteren 12 Tagen ausgeblutet. Das so gewonnene Serum wurde in hitzeinaktivierter Form (20 min, 56° C) in der Immunfluoreszenz auf anti-RBL Aktivität ausgetestet. Nach der Inkubation der Zellen (10^6 in 100 µl) mit dem Serum wurde ein FITC-konjugiertes Ziegen-anti-Meerschweinchen-Serum (Nordic) zugegeben. Dieses Ergebnis war ebenfalls negativ, d. h. es konnte keine Fluoreszenz nachgewiesen werden.

D.V.2. Versuch der Charakterisierung durch monoklonale Antikörper

D.V.2.1. Herstellung von Hybridomzellen

Balb/c-Mäuse wurden wie beschrieben (C.II.16.1.) mit Mastzellen ($1 - 2 \times 10^6$) immunisiert. Vier Tage nach der letzten "Booster"-Injektion wurden die Tiere getötet und die Milz steril entnommen. Der spezifische Antikörpertiter des Serums war zuvor im RBL-Agglutinationsassay (C.II.16.2.) ermittelt worden. Es wurden nur diejenigen Mäuse verwendet, deren Titer in diesem Test mindestens 1:160 war.

Um Hybridomzellen zu erhalten, wurden Milzzellen und Plasmozytomzellen (NS I) im Verhältnis 10:1 (10^8 Milzzellen : 10^7 NS I-Zellen) mit PEG fusioniert. Nach der Aussaat in Zellkulturplatten (10^5 pro Vertiefung) wurden die Zellen in HAT-Medium weitergezüchtet und somit die Hybridomzellen spezifisch selektioniert (siehe C.II.16.5.).

D.V.2.2. Austestung der Konüberstände

D.V.2.2.1. Indirekte Immunfluoreszenz

Die Kulturüberstände der Hybridzellen wurden gesammelt und gegen Tyrode dialysiert. Der Überstand jeder Kultur wurde auf seinen Gehalt an Antikörpern untersucht. Für diesen "Screening"-Test erschien zunächst die indirekte Immunfluoreszenz am geeignetsten. Mastzellen ($1 - 2 \times 10^5$) wurden mit den Überständen (100 µl) inkubiert (30 min, 0° C) und anschließend zweimal gewaschen (mit je 1 ml). Nach Resuspension (in 100 µl) wurde FITC-markiertes anti-Maus-Fab (20 µl, 1:20 verdünnt) zugegeben und nochmals inkubiert (30 min, 0° C). Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

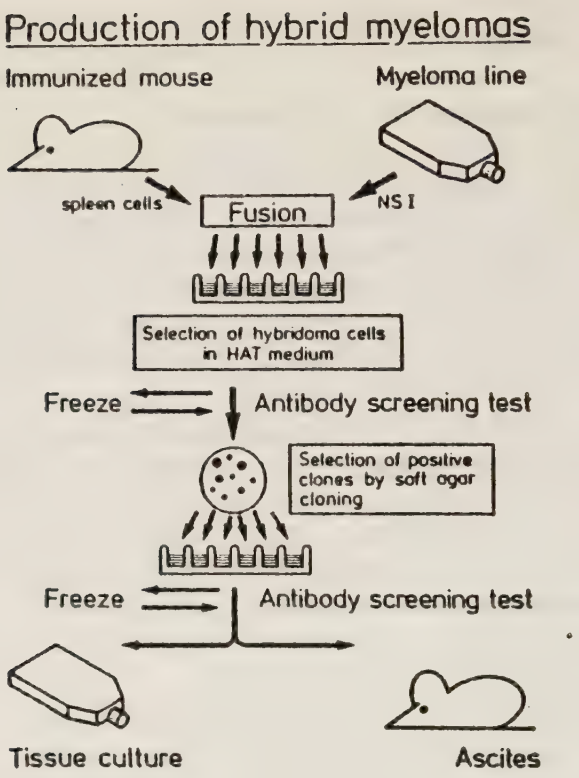

Abb. 34: Schema der Herstellung und Austestung monoklonaler Antikörper.

D.V.2.2.2. ^{125}J-h.a.IgGa-Inhibitionstest

Die in der Immunfluoreszenz stark positiven Klonüberstände wurden nun auf Antikörper untersucht, die spezifisch gegen den Fc-γ-Rezeptor gerichtet waren. Die indirekte Immunfluoreszenz gestattete nur eine Aussage darüber, ob die Kulturüberstände Antikörper mit Spezifität gegen die Zellmembran enthielten; über den genauen Angriffspunkt an der Membran konnten sie jedoch keine Auskunft geben. Deshalb wurde untersucht, ob die Antikörper die Bindung von ^{125}J-h.a.IgGa inhibieren können. Mastzellen (5×10^5 in 20 µl) wurden mit Kulturüberstand (140 µl) und ^{125}J-h.a.IgGa (10 µl, 76 S) inkubiert (1 St., 37° C). Als Kontrolle diente komplettes DMEM-Medium, daß wie die Kulturüberstände gegen Tyrode-Puffer dialysiert war. Nach dem Abschleudern durch 12 %-iges Ficoll wurde die Radioaktivität des Pellets bestimmt.

Verglichen mit dem Kontrollwert konnte bei einem Klon (B4C) eine Inhibition der h.a.IgGa-Bindung um 34.9 % beobachtet werden. Bei Reproduktionsversuchen dieses Ergebnisses traten auch Fälle auf, in denen keine Inhibition erzielt werden konnte.

Da die Zellpopulation, die diesen Antikörper produzierte, mit großer Wahrscheinlichkeit keinen homogenen Klon darstellte, wurden die Zellen mit Hilfe des Soft-Agar-Cloning vereinzelt und die gewachsenen Klone "gepickt" und neu angezüchtet (in 50 ml-Kulturfläschchen). Die Überstände wurden wiederum im ^{125}J-h.a.IgGa-Inhibitionstest untersucht, wobei die positiven Klone Inhibitionsraten zwischen 20 % und 35 % zeigten (je nach Versuchstag).

D.V.2.3. Charakterisierung der Isotypen

Die Überstände eines positiven Klons(B4CA2) wurden auf das 10 - 20-fache ankonzentriert, gegen Tyrode dialysiert und in der doppelten radialen Immundiffusion nach Ouchterlony mit

Hilfe spezifischer Antiseren (siehe Methoden) charakterisiert. Der Antikörper gehört der Klasse IgG2a an und besitzt K-Ketten.

D.V.2.4. Herstellung und Präparation von Ascites

Der Antikörpergehalt der Überstände von Hybridomzellkulturen liegt im allgemeinen zwischen 1 - 10 µg/ml. Um höhere Proteinkonzentrationen zu erreichen, wurde Ascites in Balb/c-Mäusen hergestellt; hier liegt der Antikörpertiter im mg-Bereich. Die Tiere wurden i.p. mit Pristan gespritzt (0.5 ml) und erhielten nach 10 Tagen 3 x 10^6 Hybridomzellen (in 1 ml PBS) i.p. Nach ca. 2 Wochen konnte begonnen werden, Ascites abzuzapfen.

Die Ascitesflüssigkeit wurde abgeschleudert (10 min, 600 g) und bei - 20° C eingefroren.

Um eine saubere Präparation zu erhalten, wurde der Ascites durch Ammoniumsulfat (50 %) präzipitiert und anschließend durch Chromatografie (Sephadex S-300 Superfine) aufgetrennt (siehe Abb. 4). Diese Präparation enthielt die gesamte im Ascites vorhandene 7 S Fraktion, also keinen reinen monoklonalen anti Fc-Rezeptor-Antikörper. Der Antikörper wurde im ELISA, in der indirekten Immunfluoreszenz und nochmals im ^{125}J-h.a.IgGa-Inhibitionstest untersucht.

D.V.2.4.1. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Der Test wurde wie im Detail beschrieben (siehe C.II.16.12.) durchgeführt. Als Antigenpräparation wurde das Sonikat von Mastzellen und auch RBL-Zellen benutzt. Nach der Anlagerung des Antigens an die Mikrotiterplatten und Abdecken der noch freien Bindungsstellen der Platte mit BSA, wurde der monoklonale Antikörper zugegeben und schließlich die Reaktion mit einem AP-konjugierten zweiten Antikörper entwickelt. Gleich-

zeitig durchgeführte Kontrollen enthielten entweder kein Antigen, sondern BSA, oder keinen monoklonalen Antikörper.

Abb. 35 zeigt die Ergebnisse. Sowohl mit Mastzellen als auch mit RBL-Zellen konnte eine Reaktion des Antikörpers nachgewiesen werden.

Da keine Zellmembranen als Antigen verwendet wurden, sondern nur ein durch Ultraschallbehandlung hergestelltes Homogenat, ist die Aussage dieses Tests - für sich allein betrachtet - sehr unspezifisch. Der monoklonale Antikörper könnte theoretisch mit jeder beliebigen Antigenkomponente in oder auf der Zelle regiert haben. Betrachtet man dieses Ergebnis aber im Zusammenhang mit den Fluoreszenzuntersuchungen und vor allem den h.a.IgGa-Inhibitionsversuchen, so ist es ein weiterer Beweis für die Spezifität des Antikörpers.

D.V.2.4.2. Kompetition mit der ^{125}J-h.a.IgGa-Bindung

Mastzellen (4×10^5 in 85 µl) in Tyrode-Puffer wurden mit der Ascitespräparation (100 µl) in verschiedenen Verdünnungen inkubiert (und h.a.IgGa, 76 S), durch 12 %-iges Ficoll geschleudert und die Radioaktivität des Pellets bestimmt. Die Kontrolle enthielt Tyrode-Puffer statt Ascites.

Abb. 36 zeigt, daß sowohl Inhibition als auch Enhancememt möglich sind. Bei der höchsten Konzentration des monoklonalen Antikörpers fand eine Steigerung der h.a.IgGa-Bindung um 40 % statt, während bei der schwächsten Verdünnung (10^{-4}) eine Inhibition der Bindung um 37.7 % zu beobachten war.

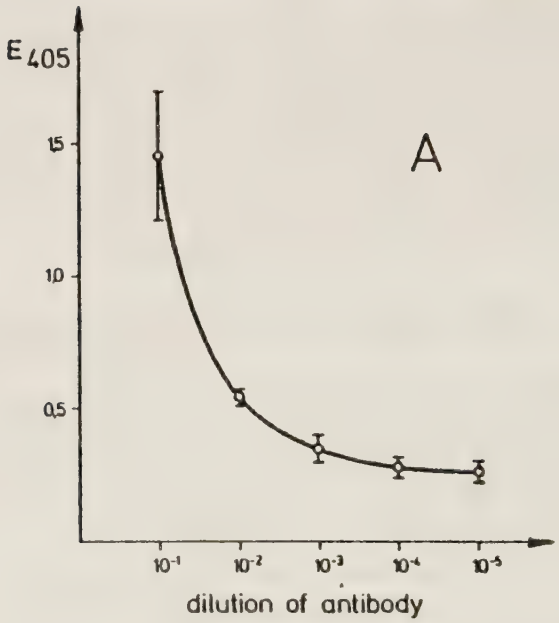

Abb. 35 A/B: Nachweis der Bindung des monoklonalen Antikörpers an Mastzellen (A) und RBL-Zellen (B) durch den ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Die Abszisse gibt die Verdünnungen einer Ascitespräparation wieder (weitere Erläuterungen siehe Text).

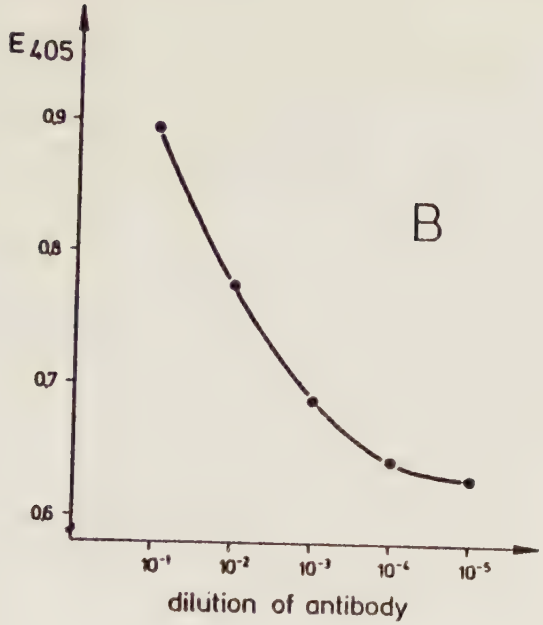

Abb. 35 B: Legende siehe vorige Seite.

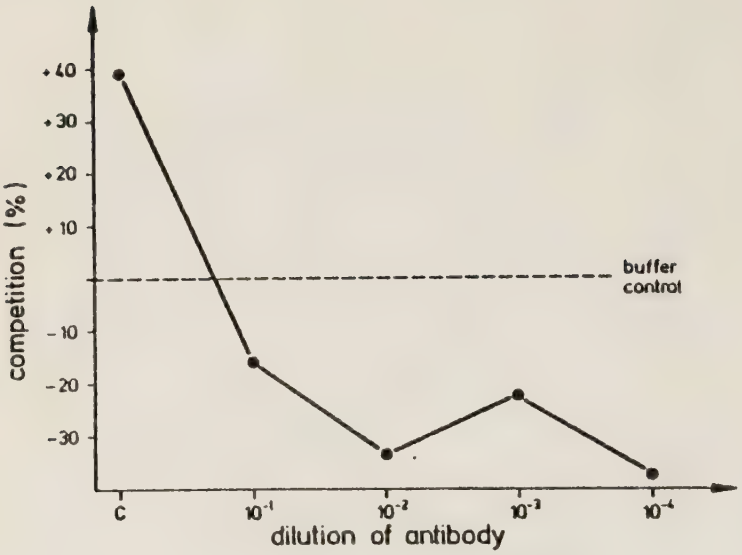

Abb. 36: Kompetition monoklonaler Antikörper (Ascitespräparation) mit der Bindung von ^{125}J-h.a.IgGa an Mastzellen. Die Kontrolle (O) enthielt Puffer (Tyrode) statt Antikörper.
c = konzentriert

D.V.2.5. Präzipitation des Rezeptors mit anti-Fc-γ-Rezeptor und Staphylococcus aureus

Nachdem der monoklonale Antikörper hinreichend charakterisiert worden war durch die geschilderten Untersuchungen (Fluoreszenztests, ELISA und ^{125}J-h.a.IgGa-Inhibitionstest), sollte nun versucht werden, mit seiner Hilfe den Rezeptor für IgGa näher zu charakterisieren, d. h. sein Molekulargewicht zu bestimmen. Mastzellen (10^7) wurden in PBS aufgenommen und mit ^{125}J (5 mCi) oberflächenmarkiert. Nach fünfmaligem Waschen wurden die Zellen in PBS (400 µl) resuspendiert. Ein Teil davon (200 µl) wurde mit anti-Fc-γ-Rezeptor (Ascitespräparation, 3 mg/ml, 500 ug) versetzt und inkubiert (1.5 St., 37° C). Der andere Teil der Zellen diente als Kontrolle und wurde mit monoklonalen Antikörpern irrelevanter Spezifität inkubiert. Diese Antikörper waren gegen Trinitrophenol gerichtet und auf dem selben Wege hergestellt und anpräpariert worden wie die anti Fc-γ-Rezeptor-Antikörper, d. h. sie waren aus Ascites durch Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Sephacryl-S-300 Chromatographie isoliert worden. Die Proteinkonzentration betrug ebenfalls 3 mg/ml.

Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Zugabe von 10 %-igem NP 40 (77 µl, Endkonzentration 1 %) solubilisiert (2 St., bei 4° C) und anschließend die unlöslichen Partikel durch Zentrifugation entfernt (15 min, 4.000 g). Der Überstand von Probe und Kontrolle (je ca. 700 µl) wurde mit der gleichen Menge Staphylococcus aureus-Suspension (10 %-ig) über Nacht inkubiert (4° C im Rotator). Die Bakterien wurden abgeschleudert und je 4 x in NET-Puffer mit 0.5 %, 0.1 % und 0.05 % NP 40 gewaschen. Anschließend wurde zu dem Sediment Probenpuffer (100 µl) für die SDS-PAGE gegeben und das ganze im Wasserbad gekocht (10 min.). Ein Aliquot der Proben (30 µl) wurde auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel autoradiographisch behandelt.

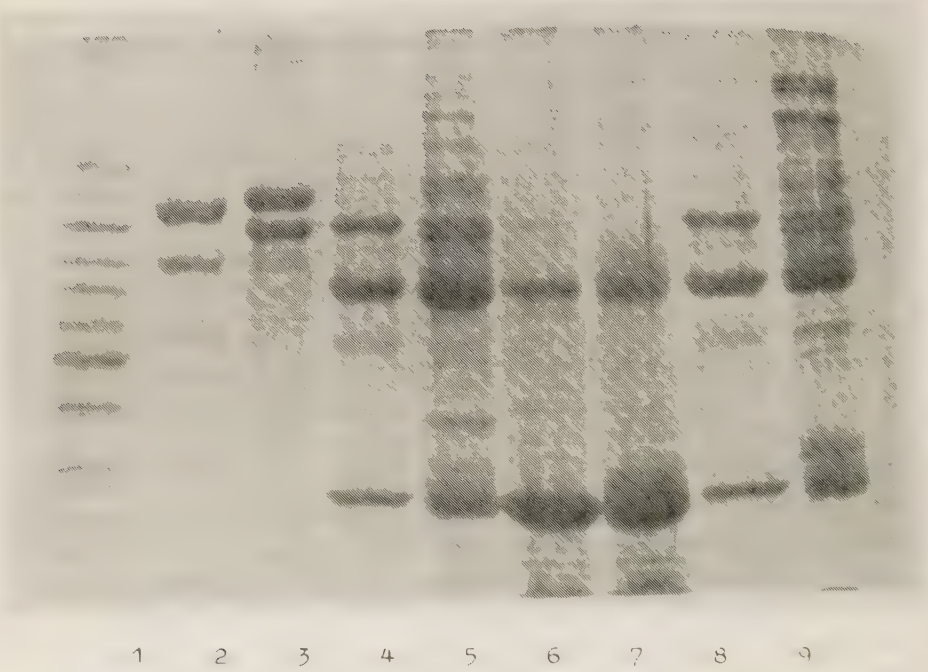

Abb. 37: Versuch der Rezeptordarstellung in der SDS-PAGE (7.5 %-Gel). Mastzellen (oberflächenmarkiert mit ^{125}J) waren mit monoklonalem anti-Fc-γ-Rezeptor inkubiert worden. Nach anschließender Solubilisierung (1 % NP40) wurden die Rezeptor-Antikörper-Komplexe mit Staphylococcus aureus adsorbiert und in der SDS-PAGE dargestellt. Als Kontrolle wurde monoklonales anti-TNP verwendet.

1 - 3 Eichproteine zur Molekularbestimmung

4 Kontrollsolubilisat (mit anti-TNP) vor der Adsorption mit Staphylococcus aureus

5 Solubilisat mit anti-Fc-γ-Rezeptor vor der Adsorption mit Staphylococcus aureus

6 Kontrolle nach Adsorption mit Staphylococcus aureus

7 anti-Fc-γ-Rezeptor-Solubilisat nach Adsorption mit Staphylococcus aureus

8 monoklonales anti-TNP

9 monoklonales anti-Fc-γ-Rezeptor

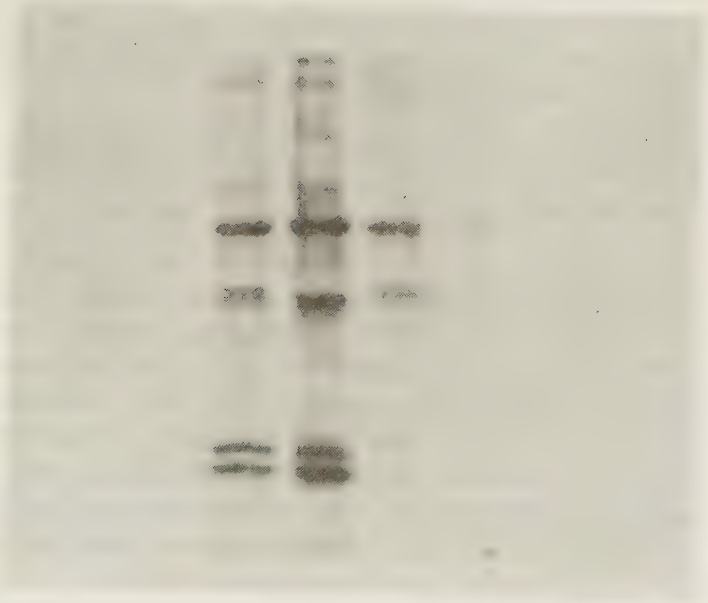

Abb. 38: Autoradiogramm des SDS-Polacylamidgels aus Abb. 37. Die abgebildeten Spuren entsprechen den Nr. 4 - 7 aus Abb. 37.

Das gefärbte (Coomassie Blue) und getrocknete Gel ist in Abb. 37 zu sehen. Spur 6 zeigt das Kontrollpräzipitat mit dem anti-TNF-Antikörper, Spur 7 die eigentliche Probe. Auf die beiden benachbarten Spuren 8 und 9 sind die verwendeten Antikörperpräparationen allein aufgetragen. Die Spuren 4 und 5 zeigen Proben der Zellsolubilisate vor der Immunpräzipitation mit den Staphylococcen.

Belichtet man mit diesem Gel einen Röntgenfilm, so ergibt sich das in Abb. 38 dargestellte Bild. Zwischen den entscheidenden Gelspuren 6 und 7, die die Kontrolle und das Rezeptorpräzipitat darstellen, ist kein Unterschied in der Bandenverteilung auszumachen. Es ist offensichtlich nicht gelungen, den Rezeptor anzureichern.

D.V.2.6. Versuch der Charakterisierung durch den "Western-Blot"

Mastzellen (10^7) wurden in NP 40 (1 % in PBS) solubilisiert (2 St., 4° C), unlösliche Partikel abgeschleudert (15 min, 4.000 g) und der eine Teil des Überstandes (250 µl) mit dem gleichen Volumen doppelt konzentriertem Probenpuffer für die SDS-PAGE versehen und aufgekocht (10 min). Der andere Teil wurde nicht weiter behandelt. Aliquote beider Proben (je 30 und 40 µl) wurden über ein 7.5 %-Gel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde ein Nitrozellulosefilter auf das Gel gelegt und die im Gel aufgetrennten Proteine wie beschrieben (C.II.17.6.) auf elektrophoretischem Wege auf den Filter transferiert. Die Kontrollfärbung einer Gelspur des Filters nach dem Transfer mit Amidoschwarz zeigte, daß der Proteintransfer nahezu quantitativ stattgefunden hatte.

Nachdem die ungefärbten Filterteile mit BSA-haltigem Beschichtungspuffer abgedeckt worden waren, wurden sie in Waschpuffer gewaschen und dann mit anti-Fc-γ-Rezeptor-Antikörper beschichtet (0.5 ml pro Gelspur, 30-300 ug). Nach der In-

kubation (3 St., 37° C) wurden die Filter nochmals gründlich gewaschen (5-mal)und mit dem zweiten Antikörper (^{125}J-anti-Maus-Ig, 1.5 µCi in 0.5 - 1 ml pro Gelspur) inkubiert (6 St., 37° C). Nach gründlichem Waschen wurden die Filter getrocknet und einem Röntgenfilm exponiert.

Wie schon der im letzten Kapitel geschilderte Weg der Immunpräzipitation des Rezeptors scheiterte auch dieser Darstellungsversuch. Auf dem belichteten Röntgenfilm war keine Bande zu erkennen.

D.V.2.7. Versuch des direkten immunologischen Nachweises in SDS-Polyacrylamidgelen

Da die Darstellung des Rezeptors durch den "Western-Blot" ebenfalls fehlgeschlagen war, wurde die Methode etwas vereinfacht und der Transfer des Proteins aus dem Gel auf den Nitrozellulosefilter umgangen.

Mastzellen wurden wie beschrieben solubilisiert (1 % NP 40) und auf ein SDS-Gel aufgetragen (7.5 %). Nach dem Lauf wurde das Gel in einem Fixierbad geschüttelt (2 St.) und anschließend in Puffer A äquilibriert. Anschließend wurde der monoklonale Antikörper zugegeben und nach intensivem Waschen wurde mit ^{125}J-markiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig beschichtet. Nach nochmaligem, ausgiebigem Waschen (72 St.) wurde das Gel getrocknet und einem Röntgenfilm exponiert.

Nach ein bis zwei Wochen war auf dem Film keine Bande festzustellen. Auch dieser Darstellungsversuch war fehlgeschlagen, so daß es insgesamt gesehen nicht gelungen ist, den Rezeptor dazustellen.

Diese Resultate werden im Abschnitt "Diskussion" besprochen.

E. Diskussion

Es konnte gezeigt werden, daß Rattenmastzellen und Rattenbasophile Leukämiezellen einen Rezeptor für das Fc-Stück des Ratten IgGa besitzen. Der zytotrope Antikörper bindet sich als Hitzeaggregat oder als Immunkomplex an seine Zielzelle; liegt der Antikörper als Monomer vor, ist seine Affinität zu niedrig, um in vitro eine Bindung an den Rezeptor nachzuweisen. Die Bindung der multivalenten Hitzeaggregate oder Immunkomplexe verläuft in Abhängigkeit von der Zeit, Temperatur, vom pH des Inkubationsmediums, der Ca^{++}-Ionen-Konzentration, der Ligandenkonzentration und der Zahl der für die Bindung verfügbaren Fc-Stücke.

Dosis-Wirkungs- und Kompetitionsversuche zeigten ebenso wie Bindungsstudien bei verschiedenen pH-Werten, daß die Zahl der auf der Zelloberfläche verfügbaren Rezeptoren offensichtlich variabel ist.

Untersuchungen zur biologischen Wirksamkeit des IgGa ergaben, daß der Antikörper die IgE-vermittelte Mediatorensekretion dosisabhängig inhibieren oder stimulieren kann.
Reinigungsversuche des Rezeptors mit verschiedenen Methoden waren nicht erfolgreich; deshalb konnte die Frage nach der Identität von Fc-γ- und Fc-ε-Rezeptor nicht zweifelsfrei beantwortet werden, obwohl verschiedene Punkte, die noch diskutiert werden sollen, für eine Nicht-Identität sprechen.

E.1. Rosetten- und Fluoreszenzversuche

Die in Kapitel D.I. geschilderten Versuche haben den ersten Nachweis der Bindung von IgGa an Mastzellen und RBL-Zellen erbracht. Es wurde deutlich, daß IgGa in aggregierter Form vorliegen muß, um sich binden zu können. Der quantitative Unterschied zwischen rosettierenden RBL (10.5 %)- und Mastzellen (48 %) deutet darauf hin, daß RBL-Zellen entweder

weniger Rezeptoren für IgGa besitzen, oder daß diese Rezeptoren eine niedrigere Affinität zu ihrem Liganden haben als diejenigen auf Mastzellen.

Ein wichtiges Resultat war die Feststellung, daß Mastzellen aus Nip. bras. infizierten Ratten genausoviel Rosetten gebildet haben wie Mastzellen von normalen Tieren, obwohl ihre Oberfläche mit IgE-Molekülen besetzt ist (Ishizaka, König, Kurata, Mauser und Ishizaka, 1975). Wäre der Fc-γ-Rezeptor mit dem IgE-Rezeptor identisch, müßte die Bindungsrate des IgGa bzw. der Prozentsatz der rosettenbildenden Zellen gegenüber Mastzellen von normalen Tieren entscheidend erniedrigt sein. Da dies nicht der Fall ist (Tabelle 1), bindet sich das IgGa offensichtlich nicht an den IgE-Rezeptor. Ein schlüssiger Beweis ist hiermit jedoch nicht erbracht, da die Rosettentechnik nicht so exakte Aussagen erlaubt wie z. B. Bindungsversuche mit radioaktiv markierten Proteinen.

Die Fluoreszenzversuche deuten in die gleiche Richtung wie die Rosettenversuche. Normale wie auch IgE-besetzte Mastzellen sind in der Lage, h.a.IgGa zu binden. Quantitative Aussagen sind allerdings mit dieser Technik kaum möglich.

E.2. Bindungskinetik

Abb. 11 zeigt, daß die Bindung von h.a.IgGa an RBL-Zellen zeit- und temperaturabhängig verläuft. Nach 30 min ist der größte Teil der Bindung abgelaufen. Die Geschwindigkeit der IgE-Bindung ist höher (Kulczycki, Isersky und Metzger, 1974), was auf eine stärkere Affinität des IgE-Moleküls zu seinem Rezeptor hindeutet.
Wie aus Abb. 11 ebenfalls hervorgeht, ist die Bindung von h.a.IgGa in der Wärme (37° C) effizienter als in der Kälte (0° C). Bei den beiden kleinen Aggregaten (10 und 44 S) tritt dieser Effekt deutlicher hervor als bei den 61 und 130 S-Aggregaten.

E.3. Der Einfluß des pH

Eine Veränderung des pH führte bei den Bindungsstudien zu extremen Veränderungen der Bindungsrate von h.a.IgGa an seinen Rezeptor. Wurde der pH des Inkubationspuffers auf 5.5 - 6.4 gesenkt, so stieg die Bindungsrate bei RBL-Zellen auf das fünf- bis sechsfache des Wertes bei pH 7.4. Im alkalischen Bereich sank sie hingegen bis zu 75 %. Abb. 12 zeigt, daß dieser Einfluß des pH zumindest im sauren Bereich bei Mastzellen geringer ist als bei RBL-Zellen. Bei pH 5.6 ist die Bindungsrate bei Mastzellen nur etwa 1.5 mal so hoch wie bei pH 7.4, während sie RBL-Zellen versechsfacht ist. Obwohl der Wert signifikant ist, stellt sich die Frage nach der Ursache dieser Diskrepanz zwischen Mast- und RBL-Zellen.

Kürzlich wurden Ergebnisse über das Verhalten der IgE-Rezeptoren auf Mastzellen während des Reinigungsprozesses aus Peritonealzellen veröffentlicht (Coutts, Nehring und Jariwala, 1980). Die Autoren zeigen, daß die Zahl der pro Mastzelle verfügbaren IgE-Rezeptoren signifikant abhängig ist von der Reinigungsmethode, mit der diese Zellen gewonnen wurden. Ungereinigte Mastzellen wurden mit solchen, die über BSA, Ficoll oder Metrizoat gereinigt waren, verglichen. Es ergab sich, daß gereinigte Mastzellen 50 - 80 % weniger IgE-Rezeptoren trugen als ungereinigte Mastzellen; die Assoziationskonstante dieser verbliebenen Rezeptoren blieb allerdings dieselbe. Rezeptoren, die schon vor der Reinigung mit IgE besetzt waren, waren auch noch nach der Reinigung auf der Zelle nachweisbar. Diese Untersuchungen, die allerdings von anderen Autoren bestritten werden, zeigen, daß der Zustand der Mastzellmembran in starkem Maße von der Art des Reinigungsmediums abhängt, dem die Zellen ausgesetzt sind. Es ist durchaus möglich, daß durch die Präparationsmethode auch die Zahl oder die Affinität der Fc-Rezeptoren für IgGa verändert wird. Falls ein großer Verlust dieser Rezeptoren während der Zellanreicherung stattfin-

den sollte, sind Veränderungen im Bindungsverhalten, d. h. reduzierte Bindungskapazität, zu erwarten. Diese Einflüsse fallen bei der Verwendung von RBL-Zellen weg, da sie in Kultur gehalten werden und vor Gebrauch lediglich gewaschen werden müssen, um Mediumreste zu entfernen. Ein Reinigungsschritt findet nicht statt.

Die Ergebnisse der pH-Bindungsversuche bedeuten für die in vivo Verhältnisse eine vermehrte Bindung von IgGa-Immunkomplexen an Mastzellen und basophile Leukozyten bei saurem pH. Ein ähnliches Phänomen ist kürzlich durch Immunfluoreszenzstudien an Fc-Rezeptoren für IgG auf Nager-Enterozyten beobachtet worden (Morris, 1980). Der Autor stellte fest, daß IgG sich bei saurem pH (5.5 - 6.5) bedeutend effektiver an Enterozyten des Duodenums oder Jejunums bindet, nicht jedoch des Ileums. Er schlägt einen Fc-Rezeptor abhängigen Transportmechanismus in den Enterozyten vor, durch den IgG-Rezeptorkomplexe in Transportvesikel überführt werden (Morris, 1978). Nach einer weiteren Hypothese (Rodenwald, 1973) soll das IgG nach dem Vesikeltransport durch Exozytose in den Interzellularraum abgegeben werden, da hier der pH alkalisch ist.

Da bei Entzündungen, die bei der Typ I Reaktion auftreten, der pH stark absinkt, hat dies eine vermehrte Bindung von IgGa-Immunkomplexen zur Folge. Eventuell wird auch durch erhöhte Gefäßpermeabilität während einer Entzündungsreaktion der verstärkte Übertritt von IgGa-Molekülen (und anderen Antikörpern) in das umliegende Gewebe erst ermöglicht.

Für die erhöhte Affinität des h.a.IgGa zu seinem Rezeptor kann es mehrere Erklärungen geben. Eine Veränderung der Größe der Aggregatmoleküle konnte durch Rezentrifugation der verwendeten Hitzeaggregate im Sucrose-Dichtegradienten ausgeschaltet werden (Abb. 13). Die Zellviabilität hatte sich ebenfalls unter den Inkubationsbedingungen nicht verändert,

wie durch Trypanblau-Färbung gezeigt werden konnte. Eine andere Möglichkeit wäre eine Ladungsveränderung des IgGa-Moleküls mit wechselndem pH. Aufgrund der veränderten Ladung würde sich dann auch die Bindungsaffinität verändern.

Wahrscheinlich sind aber für die veränderte Bindungsrate Änderungen der Membranmobilität verantwortlich, die eine veränderte Rezeptorenzahl zur Folge haben. Diese Annahme wird unterstützt durch die Dosis-Wirkungskurven (Abb. 16) bei pH 7.4 und 6.4. In beiden Fällen scheint die Zahl der Rezeptoren variabel zu sein, nur ist dieser Prozeß bei pH 6.4 bereits abgeschlossen, während er bei pH 7.4 durch bestimmte Ligandenkonzentrationen erst in Gang gesetzt wird, was sich dadurch ausdrückt, daß scheinbar mehrere Sättigungsplateaus erreicht werden.

Interessant ist in diesem Zusammenhang das Verhalten des Immunglobulin E. Wie aus Abb. 14 hervorgeht, ist die Bindung des IgE an seinen Rezeptor im gemessenen Bereich unabhängig vom pH-Wert, d. h. die Bindungsrate blieb in allen Fällen gleich. Es ist bekannt, daß IgE bei saurem pH (pH 3 - 4) von der Zelle abdissoziiert (Conroy, Adkinson und Lichtenstein, 1977). Auf in vivo Verhältnisse übertragen bedeutet dies, daß während des Entzündungsverlaufs eventuell ein Austausch von IgE und IgGa-Molekülen stattfinden kann. Während die Affinität des IgE sinkt, steigt diejenige von IgGa-Immunkomplexen.

E.4. Kompetitionsexperimente

E.4.1. Kompetition von h.a.IgGa mit der Bindung von ^{125}J-h.a.IgGa

Die Bindung von ^{125}J-h.a.IgGa an RBL-Zellen konnte durch Zugabe von nicht-markiertem,kaltem h.a.IgGa sowohl inhibiert wie auch verstärkt werden (Tabelle 3). Bei der Interpretation

dieser Ergebnisse muß betont werden, daß die verwendeten, nicht-markierten Aggregate hinsichtlich ihrer Größe nicht näher definiert waren. Sie wurden durch Erhitzen einer 2 %-igen Lösung wie im Methodenteil beschrieben hergestellt, d. h. man erhält eine Mischung aus kleinen und großen Aggregaten (siehe auch Abb. 2). Das ^{125}J-markierte Aggregat hatte eine Sedimentationskonstante von 44 S. Tabelle 3 zeigt, daß bei einem 7.6-fachen Überschuß an nicht-markierten Aggregaten die Bindungsrate des ^{125}J-h.a.IgGa um 54 % gegenüber der Kontrolle steigt (Kontrolle = ohne h.a.IgGa). Erst bei Zugabe eines 20.000-fachen Überschusses an nicht-markierten Aggregaten wird die Bindung des 44 S Aggregats um 28 % inhibiert. Dieser hohe Überschuß ist wahrscheinlich deshalb nötig, weil die zur Inhibition verwendeten Aggregate sehr viele Moleküle enthalten, die kleiner als 44 S sind und deshalb die Bindung von ^{125}J-h.a.IgGa (44 S) nicht hemmen können. Aufgrund der Präparationsmethode für Hitzeaggregate definierter Größe (Isolation über Sucrose-Dichtegradienten) ist es sehr schwer, größere Mengen, die für ein Kompetitionsexperiment nötig wären, herzustellen.

Wie schon für die Bindungsstudien unter verschiedenen pH-Bedingungen beschrieben, scheint es auch hier, ähnlich wie bei den Dosis-Wirkungsstudien, zu einer Veränderung der Membranmobilität zu kommen, deren Resultat offensichtlich eine erhöhte Zahl von Fc-γ-Rezeptoren auf der Zelloberfläche ist. Dies führt bei entsprechenden Konzentrationsverhältnissen (Tabelle 3) zu einer erhöhten Bindungsrate von ^{125}J-h.a.IgGa. Erst wenn die Konzentration der kalten Aggregate sehr hoch wird, kann es zur Inhibition kommen, vermutlich, weil die neuen Bindungsstellen von den kalten Aggregaten abgesättigt werden können.

E.4.2. Kompetition von h.a.IgGa mit der Bindung von ^{125}J-IgE

H.a.IgGa konnte die Bindung von ^{125}J-IgE an RBL-Zellen in hohen Dosen (120 µg) bis zu 50 % inhibieren (Abb. 17). Mit niedrigen Dosen h.a.IgGa wurde die Bindungsrate von ^{125}J-IgE erhöht (30 %). Die Zellen waren mit h.a.IgGa vorinkubiert worden (30 min); ohne einen dazwischengeschalteten Waschgang wurde dann das ^{125}J-IgE zugegeben.

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, hatten Halper und Metzger (1976) kompetitive Wechselwirkungen zwischen der Bindung von IgGa-Immunkomplexen und IgE postuliert. Durch Vorinkubation von RBL-Zellen mit den Komplexen konnten sie die IgE-Bindung um 60 % inhibieren. Allerdings trat bei ihren Versuchen niemals eine Erhöhung der IgE-Bindungsrate auf. Aus ihren Ergebnissen zogen die Autoren den Schluß, daß sich das IgGa an den gleichen Rezeptor bindet wie das IgE. Da sie jedoch Immunpräzipitate für die Versuche verwendeten, lag die Erklärung der Ergebnisse durch eine rein sterische Inhibition auf der Hand.

Bei den hier geschilderten Kompetitionsversuchen wurden Hitzeaggregate verwendet, die hinsichtlich ihrer Größe nicht definiert waren. Wie in Abb. 17 dargestellt, wurden mit einer anderen (ähnlichen) Aggregatpräparation (gestreifter Balken) ähnliche Ergebnisse erzielt. Alle verwendeten Präparationen waren vor Gebrauch zentrifugiert worden (4.000 g) und waren somit frei von unlöslichen Partikeln.

Trotz Verwendung relativ kleiner, löslicher Partikel ist eine sterische Inhibition nicht auszuschließen. Allerdings kann durch sterische Inhibition nicht erklärt werden, wieso bei bestimmten Konzentrationen von h.a.IgGa eine Steigerung der IgE-Bindungsrate stattfindet.

Eine Hemmung der IgE-Bindung kann auf verschiedene Weise zustandekommen: 1. durch Bindung des h.a.IgGa an den gleichen Rezeptor, wodurch die IgE-Bindungsrate sinkt; 2. durch sogenanntes "Co-capping". Wenn Rezeptoren miteinander verknüpft werden, z. B. über ihre Liganden, machen sie (bei 37° C) eine Lateralbewegung durch; dies wird als "Capping" bezeichnet. Das Ende dieses Prozesses ist dann erreicht, wenn alle Rezeptoren an einem Pol der Zelloberfläche zusammengeflossen sind. Nun ist aber bekannt, daß manche Rezeptoren andere während des "Cappings" mitreißen können (Sarmay, Sanderson und Ivanyi, 1979). Die Zahl dieser Rezeptoren auf der Zellmembran sinkt natürlich durch diesen Prozeß ebenfalls; 3. durch sterische Inhibition, die dadurch zustande kommt, daß ein Aggregatmolekül bei der Bindung an die Zelle IgE-Rezeptoren überdeckt. Die IgE-Moleküle finden den so verdeckten Bindungspartner nicht mehr. Wie durch die Dosis-Wirkungskurven, pH- und Kompetitionsversuche mit h.a. IgGa und ^{125}J-h.a.IgGa gezeigt wurde, führt die Bindung von h.a.IgGa oder die Veränderung des pH zu einer tiefgreifenden Änderung der Membranmobilität, deren Resultat eine Vermehrung der Fc-γ-Rezeptorenzahl ist. Über das Verhalten der IgE-Rezeptoren unter diesen Bedingungen kann nur spekuliert werden, jedoch werden sie mit großer Wahrscheinlichkeit zumindest passiv in strukturelle Umordnungsprozesse miteinbezogen. Ob diese Veränderungen auch die Affinität des IgE zum Fc-ε-Rezeptor beeinflussen, kann nicht entschieden werden.

Tatsächlich scheint ein sehr komplexer Regelmechanismus für die Reaktionsbereitschaft der Mastzelle vorzuliegen, bei dem das IgGa in Form von Immunkomplexen eine große Rolle spielt. Je nach h.a.IgGa-Dosis bindet die Mastzelle mehr oder weniger IgE und hat damit ihren Sensibilisierungsgrad weitgehend festgelegt.

In einem Parallelversuch wurden RBL-Zellen mit ^{125}J-IgE vorinkubiert; h.a.IgGa wurde anschließend zugegeben. Wie Abb. 17 zeigt, scheint ^{125}J-IgE während der Inkubation mit den Aggregaten zu einem Teil (20 %) wieder von der Zelle entfernt zu werden. Da dieser Prozentsatz aber nicht sehr hoch ist, besteht durchaus die Möglichkeit, daß von der Membran dissoziiertes IgE aufgrund der kompetitiven Wechselwirkung der IgE- mit der h.a.IgGa-Bindung nicht mehr - oder nur stark vermindert - an die Membran gebunden werden kann.

E.5. Berechnung der gebundenen h.a.IgGa Moleküle pro RBL-Zelle

Die Berechnung der gebundenen h.a.IgGa-Moleküle pro RBL-Zelle durch eine Analyse nach Scatchard (1949), die auch die Bestimmung der Assoziationskonstanten miteingeschlossen hätte, ist aufgrund verschiedener Schwierigkeiten nicht gelungen. Wie aus den Dosis-Wirkungsstudien hervorgeht, ist die Zahl der verfügbaren Rezeptoren offenbar nicht konstant, sondern scheint eine Funktion der Ligandenkonzentration zu sein. In die gleiche Richtung deuten auch die Kompetitionsexperimente. Vor allem bei niedrigen Konzentrationen an nicht-markiertem h.a.IgGa trat eine eindeutige Erhöhung der Bindungsrate auf (54 % bei 0.9 µg h.a.IgGa). Dieses Merkmal der Rezeptor-Liganden-Interaktion findet bei der graphischen Auftragungsweise nach Scatchard (Abszisse: Zahl der gebundenen Moleküle = B; Ordinate: Zahl der gebundenen Moleküle/freien Moleküle = B/F).ihren Ausdruck darin, daß die Werte für B/F paradoxerweise ansteigen statt zu fallen. So kommt es natürlich nicht zu einem Schnittpunkt mit der X-Achse des Koordinatensystems. Im Bereich der Hormonbiologie sind solche Effekte schon seit langem bekannt (Rodbard und Bertino, 1973; Schwarz, 1977). Die Autoren führen das Ansteigen der B/F-Werte - welches im übrigen durch sehr hohe Ligandenkonzentrationen aufgehoben wird - auf mehrere Ursachen zurück:

1. Multivalente Bindung, die im Falle der h.a.IgGa-Bindung vorliegt und im Grunde nichts anderes ist als sogenannte kooperative Bindung zwischen gleichen Rezeptormolekülen.
2. Kooperative Bindung zwischen zwei oder mehreren Bindungsstellen. Nach dieser Vorstellung entstehen bei der Rezeptor-Liganden-Interaktion durch allosterische Effekte neue Bindungsstellen, die sich eventuell mit den alten überlappen (oder auch nicht) und deren Affinität zum Liganden höher sein kann als die der primär vorhandenen.
3. Der anfänglich ansteigende Kurvenverlauf kann auch ein Artefakt sein, das dadurch zustande kommt, daß viele Rezeptoren stabiler sind, wenn sie eine Verbindung mit dem Liganden eingegangen sind, so daß bei Inkubation mit niedriger Ligandenkonzentration ein größerer Abbau der Rezeptormoleküle stattfindet (Chamness und Mc Guire, 1975).

Will man den Verlauf der Dosis-Wirkungskurven (bei pH 7.4) mit Hilfe dieser Vorstellungen erklären, so müßte man annehmen, daß mit steigender Ligandenkonzentration neue Bindungsstellen entstehen (durch allosterische Effekte). Ob diese Bindungsstellen die gleichen sind wie die ursprünglich vorhandenen, kann nicht entschieden werden.

Schwierig ist in diesem Zusammenhang auch die Interpretation der Ergebnisse aus den Bindungsstudien bei verschiedenen pH-Werten. Wie aus Abb. 16 B hervorgeht, ist die Bindungsrate bei pH 6.4 für ein 130 S Aggregat ca. 80 %, während bei pH 7.4 (Abb. 16 A) nur etwa 18 % des angebotenen ^{125}J-h.a.IgGa gebunden werden. Zusätzlich zeigt der Kurvenverlauf der Bindung bei pH 7.4 ein anderes Bild als bei pH 6.4. Während die Bindungsrate bei pH 7.4 in Abhängigkeit von der ^{125}J-h.a.IgGa-Konzentration verschiedene Plateaus erreicht, zeigt das Verhalten bei saurem pH-Wert den Verlauf einer typischen Sättigungskurve. Hier erhebt sich die Frage, ob dieser veränderte Kurvenverlauf das Resultat einer einfachen Vermehrung der verfügbaren Rezeptoren ist, oder ob Rezeptoren einer verän-

derten Struktur und einer anderen Assoziationskonstanten entstanden sind. In jedem Fall ist eine mehr oder große Mobilität der Membran die Voraussetzung. Diese Mobilität kann induziert werden durch eine Veränderung des pH-Wertes oder der Ligandenkonzentration. Es ist sehr wahrscheinlich, daß in beiden Fällen ein gemeinsamer Prozeß eingeleitet wird.

Wie schon in der Einleitung beschrieben, gibt es auf Mäusemakrophagen einen Rezeptor für aggregiertes IgG2b (Anderson, 1980), für dessen Funktionsfähigkeit Phospholipide nötig sind. Der Autor hatte zwei Erklärungsmöglichkeiten dafür angeboten. Die Lipide könnten 1. für die Stabilisierung des multivalenten Komplexes in der Membran wichtig sein oder 2. für die Funktionsfähigkeit jedes Rezeptors. Der Effekt der multivalenten Bindung kann natürlich nur wirksam sein, wenn eine gewisse Stabilität des Rezeptorkomplexes da ist. Insofern spielt die Beschaffenheit der zwischen den Rezeptoren liegenden Membranbereiche sicher eine große Rolle. Andererseits scheint die Zellmembran erst durch die Bindung von h.a.IgGa eine Beweglichkeit zu erlangen, die zur Darstellung neuer Rezeptorenstrukturen führt. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind die Phospholipide aufgrund hydrophober Wechselwirkungen für die Orientierung der einzelnen Rezeptoren in der Membran verantwortlich.

Zur Modulation der Fc-Rezeptorenzahl gibt es in der Literatur eine Reihe von Beiträgen, die zeigen, daß zahlreiche Reagenzien in der Lage sind, die Expression von Fc-Rezeptoren zu beeinflussen. Itoh und Kumaghi (1980) stellten fest, daß humane Lymphozyten bei Inkubation mit Neuraminidase eine erhöhte Zahl von Fc-γ-Rezeptoren auf der Zelloberfläche aufwiesen, während die Zahl der Fc-Rezeptoren für IgM sank. Offensichtlich waren die Fc-γ-Rezeptoren von der Neuraminsäure maskiert worden. Fridman et al. (1980) zeigten, daß T-Zell-Hybride der Maus durch Zugabe von Interferon eine erhöhte Zahl von Fc-γ-Rezeptoren hatten; Interferon hebt den zyklischen GMP-Spiegel. Schneck et al. (1981) untersuchten die Wirkung

von cAMP auf die Expression von Fc-γ-Rezeptoren auf Mäusemakrophagen und registrierten eine signifikante Vermehrung neben einer deutlichen Zunahme der Fc-vermittelten Phagozytose. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Burchiel und Warner (1980), die für ihre Studien einen Virus-induzierten prä-B-Zell-Tumor benutzten. Induktoren für cAMP wie z. B. Isoproterenol, Prostaglandin E_1 oder 3-isobutyl-1-methylxanthin sowie 8 Br cAMP führten zu einer Vermehrung der Fc-γ-Rezeptoren, während sie von cGMP-Induktoren wie Prostaglandin $F_{2\alpha}$ oder 8 Br cGMP verhindert wurde. Außerdem konnten sie zeigen, daß auch ein vom cAMP unabhängiger Mechanismus zur Expression von Fc-γ-Rezeptoren existiert. Lipopolysaccharid und fötales Kälberserum vergrößerten die Zahl der Fc-Rezeptoren, konnten aber im Gegensatz zu den Induktoren von cAMP nicht durch cGMP oder dessen Induktoren gehemmt werden.

Von Dezsö und Foris (1981) wurde ein anderer Mechanismus für die Regulation der Fc-γ-Rezeptoren postuliert. Sie zeigten, daß Angiotensin II in Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-7} M die Ausprägung von Fc-γ-Rezeptoren auf Rattenmakrophagen unterdrückt, während es im Bereich zwischen 10^{-7} und 10^{-8} M zu verstärkter Ausprägung kommt. Diese Wirkung war durch Cytochalasin B und Vinblastin inhibierbar. Cytochalasin B führt zu einem Bruch der Mikrofilamente, Vinblastin zur Depolymerisation der Mikrotubuli. Es scheint also, daß auch die Strukturen des Zytoskeletts an der funktionellen und strukturellen Regulation von Fc-Rezeptoren beteiligt sind.

Im Falle der Fc-Rezeptoren für IgGa auf Mastzellen ist es also durchaus möglich, daß die Zahl der Rezeptoren nach der Bindung des IgGa über intrazelluläre Prozesse, z. B. die Erhöhung des cAMP-Spiegels oder Veränderungen in mikrotubulären Strukturen reguliert wird. Andere Mechanismen, wie allosterische Veränderungen der schon vorhandenen Rezeptoren nach Ligandenbindung sind durch diese Erklärung natürlich

nicht ausgeschlossen. Das Verhalten der Zelle bei saurem pH des Mediums deutet ebenfalls in diese Richtung. Eine veränderte Fluidität der Membran bzw. eine Umorientierung von Phospholipid- und Proteinstrukturen könnte durchaus zu den beschriebenen Erscheinungen führen.

E.6. Inhibition der h.a.IgGa-Bindung durch Protein A

Die Bindung von ^{125}J-h.a.IgGa an RBL-Zellen konnte durch Voinkubation der Aggregate mit Protein A teilweise, d. h. zwischen 13.3 % und 27 %, inhibiert werden (Kapitel D.II.6.). Diese Inhibitionsversuche wurden unternommen, um einen ersten Hinweis zu bekommen, welche Stelle des IgGa-Moleküls an den Rezeptor bindet. Es ist bekannt, daß Protein A - ein Zellwandbestandteil der meisten Staphylococcus aureus Stämme - spezifisch an den Fc-Teil der meisten Säuger-Immunglobuline bindet (Kronvall, Seal, Finstad und Williams, 1970). Protein A hat ein Molekulargewicht von 42.000 dalton und besteht aus 5 Regionen, von denen 4 an das Fc-Stück binden können (Björk, Petersson und Sjöquist, 1972). Analytische Studien über die Bindungsstelle des IgG für Protein A haben gezeigt, daß das Verbindungsstück zwischen CH_2- und CH_3-Domäne des Immunglobulins Protein A binden kann (Lancet, Isenmann, Sjödahl, Sjöquist und Pecht, 1978). Die beiden Domänen allein waren nicht in der Lage, Protein A zu binden. Nur eine intakte Kombination von CH_2- und CH_3-Domäne war bindungsaktiv. Es ist natürlich auch möglich, daß CH_2- und CH_3-Domäne an der Bildung einer Bindungsstelle beteiligt sind.

Da nun die Bindung von h.a.IgGa an RBL-Zellen mit Protein A nur leicht inhibiert werden konnte (13 - 27 %), scheint die Fc-Rezeptorbindende Stelle nur teilweise mit der Protein A-Bindungsstelle identisch zu sein. Die Inhibition von 27 % wurde mit dem kleinsten der Hitzeaggregate, dem 10 S-Aggregat, erzielt. Alle anderen Aggregate (44 S, 61 S und 130 S) konnten nur in geringem Maß blockiert werden. Dies könnte daran liegen, daß die 10 S-Aggregate (Dimere) noch frei zugänglich sind für

die Protein A-Moleküle, während bei den größeren die entsprechenden Regionen durch die Aggregation schon teilweise verdeckt sind.

E.7. Abhängigkeit der Liganden-Rezeptorbindung von der Ca^{++}-Konzentration des Mediums

In Abschnitt D.II.3. ist dargestellt, daß die Ca^{++}-Konzentration des Mediums die Bindungsrate von ^{125}J-h.a.IgGa an RBL-Zellen beeinflußt. Bei einer Konzentration von 0.3 mM $CaCl_2$ war die Bindung eines 130 S Aggregats um mehr als 35 % gegenüber der Ca^{++}-freien Kontrolle erhöht. Die Bindungsrate von IgE an RBL-Zellen war unter diesen Bedingungen nur schwach erhöht (Abb. 15). Die Viabilität der Zellen hatte sich nicht geändert, wie durch Trypanblau-Färbung festgestellt wurde.

Die Anwesenheit von Ca^{++}-Ionen scheint in bestimmten Konzentrationen die Bindung von h.a.IgGa zu optimalisieren. Absolut nötig für die Bindung des Antikörpers an den Rezeptor ist Calcium aber nicht, da die Bindung auch in Calcium-freiem Milieu (TEDTA-Puffer) durchaus stattfindet, wenn auch mit erniedrigter Bindungsrate. Es ist vielmehr anzunehmen, daß die Rezeptor-Liganden-Bindung indirekt über die Calcium-Ionen-Konzentration beeinflußt wird, da das Ionen-Milieu für den jeweiligen physiologischen Status der Zelle verantwortlich ist.

E.8. Die Bindung von Immunkomplexen an RBL-Zellen

Immunkomplexe aus IgGa-anti-HSA und ^{125}J-HSA binden sich ähnlich wie auch hitzeaggregiertes IgGa an RBL-Zellen. Hitzeaggregate stellen ein praktisches und einfaches Modell für Immunkomplexe dar. Sie können Komplement aktivieren (Christian, 1960), Überempfindlichkeitsreaktionen induzieren (Ishizaka, 1963) und werden ebenso wie Immunkomplexe aus der Zirkulation entfernt (Brown, Harris, Papamichail, Sljivic und Holborow, 1973, Mauer, Fisch, Blau und Michael, 1972). Hitzeaggregate

lassen sich durch Zusatz von BSA (0.5 %) stabilisieren (Kijlstra, Lentz und van Es, 1979) und deshalb verhältnismäßig leicht handhaben. Dennoch stellen sie ein künstliches System dar und für die in vivo Situation sind Immunkomplexe sicherlich relevanter. Aus diesem Grund wurden einige der Bindungsexperimente mit definierten Hitzeaggregaten noch einmal mit Immunkomplexen wiederholt.

Immunkomplexe sind instabil. Aus diesem Grund ist das Arbeiten mit ihnen aufwendiger und problematischer als bei Verwendung von Hitzeaggregaten. Es ist z. B. nicht möglich, Immunkomplexe radioaktiv zu markieren, weil dieser Prozeß zu zeitaufwendig ist. Deshalb muß schon bei der Bildung der Komplexe soviel Radioaktivität (^{125}J) eingesetzt werden, daß nach der Isolierung von Komplexen definierter Größe durch Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation noch Bindungsversuche stattfinden können.

Die verwendeten Antikörper stammten aus der Ratte. Die IgGa-Fraktion dieses Serums war über DEAE-Chromatographie isoliert worden. Hieraus wurde dann das antigenspezifische IgGa-anti-HSA durch Affinitätschromatographie an Sepharose-HSA gewonnen. Die präzipitierenden Eigenschaften dieser Antikörperpräparation wurden in einer Präzipitationskurve nach Heidelberger analysiert (Abb. 19). Der geringe Prozentsatz der präzipitierten Radioaktivität ist auf die Affinität der Antikörper und vor allem auf die Anwesenheit von freiem ^{125}J in der ^{125}J-HSA-Präparation zurückzuführen.

Um die Bindung von IgGa-Immunkomplexen an RBL-Zellen untersuchen zu können, wurden Komplexe im Antikörperüberschuß gebildet und über Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Bindungsversuche zeigten, daß die Bindung an Fc-γ-Rezeptoren ebenso wie bei den Hitzeaggregaten temperatur- und zeitabhängig verläuft (Abb. 23). Bei saurem pH des Mediums (pH 6.4) war die Bindungsrate der Komplexe an ihren Rezeptor jedoch nur verdoppelt (verglichen mit pH 7.4), während sich unter diesen Bedingungen etwa 5 - 6-mal so viel Hitzeaggregate an die Zellen gebunden hatten.

Dieser Unterschied läßt sich vermutlich darauf zurückführen, daß die isolierten Immunkomplexe noch geringe Mengen an Sucrose enthielten, die, wie in Vorversuchen festgestellt wurde, die Bindung von IgGa-Komplexen inhibierte. Dieser Mangel konnte auch nicht beseitigt werden, da eine ganztägige Dialyse nötig gewesen wäre, um eine zuckerfreie Präparation zu erhalten.

Bindungsstudien mit Komplexen verschiedener Größe (Abb. 25) ergaben wie bei den Hitzeaggregaten eine Abhängigkeit der Bindungsrate von der Zahl der verfügbaren Fc-Stücke. Ein Vergleich mit den Hitzeaggregaten (Tabelle 6) zeigte jedoch, daß die Bindung von Immunkomplexen effektiver war als die der Aggregate. Dafür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: 1. durch die Hitzeaggregation hat das IgGa doch einen Teil seiner Aktivität eingebüßt und 2. die durch die Komplexbildung mit dem Antigen stattfindende Konformation des Fc-Stücks erhöht die Affinität von Immunkomplexen zum Fc-Rezeptor.

Abb. 25 zeigt, daß die Bindungsrate von Immunkomplexen an RBL-Zellen nicht mehr zunimmt, wenn die Komplexe größer als 100 S werden. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann nicht entschieden werden, ob daran ein teilweiser Zerfall der Immunkomplexe schuld ist oder ob die Affinität tatsächlich nicht mehr ansteigt, wenn eine bestimmte Größe der Komplexe überschritten wird.

E.9. Modulation der Mediatorensekretion durch h.a.IgGa

In der Einleitung wurde bereits dargestellt, daß die Mediatorensekretion mit dem Einstrom von Ca^{++}-Ionen in die Zelle verknüpft ist (Foreman, Hallet und Mongar, 1977). Der Calcium-Einstrom geht der Sekretion von Histamin unmittelbar voraus und stellt eine notwendige Bedingung für die Aktivierung der Zelle dar. Deshalb sind diese beiden Parameter -

Einstrom von Ca^{++}-Ionen in die Zelle und Histaminsekretion - gewählt worden,um die Rolle des IgGa beim Aktivierungsprozeß von Mastzellen und Basophilen zu untersuchen. Die enge Korrelation dieser beiden Parameter führte dazu, daß die erhaltenen Ergebnisse fast identisch waren. Deshalb sollen sie im folgenden gemeinsam besprochen werden.

Wie in Kapitel D.IV.1.2. dargestellt, führen hohe Dosen h.a. IgGa (150 µg) undefinierter Größe zu einer leichten Stabilisierung von RBL- und Mastzellen bezüglich der Histaminsekretion bzw. des Einstroms von ^{45}Ca, d. h., daß h.a.IgGa - beladene Zellen spontan weniger Histamin freisetzen (- 20 %) als unbeladene Zellen. In Ausnahmefällen führte die Zugabe von h.a.IgGa auch zu einer leichten Verstärkung des Calcium-Einstroms bzw. der Histaminsekretion. Zu einer signifikanten Histaminsekretion ist es jedoch nicht gekommen.

Im Falle der IgE-vermittelten Mediatorensekretion ist die Situation bedeutend komplexer. Wie die Abb. 31 und 32 zeigen, hängt das Verhalten der Mastzellen von verschiedenen Faktoren ab. Da die Aktivierung der Zellen durch Zugabe von anti-IgE eingeleitet wird, spielt die Konzentration des anti-IgE, genauer das Verhältnis der Zahl der zellständigen IgE-Moleküle zu der Zahl der anti-IgE-Moleküle eine entscheidende Rolle (Abb. 29 und 30). Nur wenn diese Bedingungen optimal sind, ist auch die Histaminsekretion optimal. In dieser Situation führt die Zugabe von h.a.IgGa in hohen Dosen (150 µg) zu einer starken Verminderung des Calcium-Einstroms bzw. der Histaminsekretion (80 - 90 %); vermindert man hier die Konzentration des IgGa's, wird die Hemmung aufgehoben und eventuell in ihr Gegenteil verkehrt, d. h. h.a.IgGa verstärkt die Reaktionsbereitschaft der Zelle (Abb. 32). Ist die Aktivierungssituation, d. h. das Verhältnis von IgE zu anti-IgE-Molekülen, suboptimal, so führt die Zugabe von h.a.IgGa in niedrigen Konzentrationen immer zu einer starken Steigerung bzw. sogar Vervielfachung der Histaminsekretion (Abb. 32).

Wichtig ist, daß die in Abb. 32 dargestellte Vervielfachung der anti-IgE induzierten Histaminsekretion, in absoluten Werten ausgedrückt, nicht höher ist als die unter optimalen Freisetzungsbedingungen erzielte Sekretionsleistung.

Die Wirkungsmechanismen, die zu diesem Effekt führen, sind im Rahmen dieser Arbeit nicht speziell untersucht worden. Pinzipiell gibt es verschiedene Möglichkeiten der Erklärung. Die IgGa-Aggregate können in irgendeiner Form in den biochemischen Aktivierungsprozeß der Zelle eingreifen (siehe Abb. 1), z. B. durch Modulation des cAMP- oder cGMP-Spiegels und so die Mediatorensekretion beeinflussen.

Eine andere Möglichkeit ist die Modulation schon vorhandener Desensibilisierungsmechanismen der Zelle. Sobotka, Dembo, Goldstein und Lichtenstein (1979) beschrieben einen Mechanismus, mit dessen Hilfe durch Antigen vernetzte IgE-Moleküle von der Zelle entfernt werden. Durch eine Förderung dieses Prozesses nach Bindung von h.a.IgGa könnte zwar eine Inhibition der Histaminsekretion, jedoch nicht eine Steigerung erklärt werden, es sei denn, daß durch die Entfernung von IgE-Molekülen erst optimale Bedingungen für die Mediatorensekretion entstehen.

Über den Einfluß der durch Hitzeaggregate induzierten Membranmobilität auf die Aktivierungsbereitschaft bzw. Sekretionsleistung der Mastzellen kann nur spekuliert werden. Da nach der Bindung des h.a.IgGa an die IgE-besetzten Mastzellen der Grad der Sekretion nur noch von der anti-IgE Konzentration abhängt (Abb. 32), ist es durchaus möglich, daß durch eine erhöhte Membranfluidität die Dichte der IgE-besetzten Rezeptoren auf der Zelloberfläche so verändert wird, daß die zuvor suboptimale bzw. optimale Aktivierungssituation optimal bzw. suboptimal wird.

E.10. Versuche zur Reinigung des Fc-γ-Rezeptors

Es wurde mit verschiedenen Methoden versucht, den Fc-γ-Rezeptor anzureichern. Alle Versuche waren nicht erfolgreich und sollen im folgenden einzeln besprochen werden.

E.10.1. Solubilisierung des Rezeptors nach Ligandenbindung

H.a.IgGa wurde an Zellen gebunden, deren Oberfläche mit ^{125}J markiert war. Nach Solubilisierung der Zellen mit NP 40 (1 %) wurden die h.a.IgGa-Rezeptorkomplexe mit einem Antiserum präzipitiert und in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Mit dieser Methode konnte der Rezeptor nicht dargestellt werden.

Da die Bindung des h.a.IgGa nur durch die gleichzeitige Interaktion vieler Fc-Stücke mit dem Rezeptoren stattfindet, ist es sehr wahrscheinlich, daß der Multi-Rezeptor-Komplex bei der Solubilisierung zerstört wird. Dadurch sinkt die Affinität und die Bindung des Rezeptors zum IgGa wird gelöst. Dieses Ergebnis überrascht insofern nicht, als die Konzeption des multivalenten Bindungsmodells Ausgangspunkt dieser Arbeit war. Dennoch war es theoretisch möglich, daß kleine Mengen des Rezeptors hätten angereichert werden können.

E.10.2. Isolierung mit monoklonalen Antikörpern

Es wurden monoklonale Antikörper gegen Mastzellen hergestellt (in Mäusen). Die Test- und Selektionsverfahren zur Identifizierung von anti-Rezeptor-Antikörpern waren aufwendig und durch mehrere Versuchsschritte abgesichert. Die letztlich zur Reinigung des Fc-Rezeptors für IgGa verwendete Antikörperpräparation war in indirekten Immunfluoreszenzuntersuchungen mit RBL- und Mastzellen positiv, erkannte zelluläre Antigene im ELISA und war in der Lage, die Bindung von ^{125}J-h.a. IgGa zu inhibieren (35 %). In bestimmten Konzentrationen wurde die Bindungsrate des h.a.IgGa auch erhöht.

Der Antikörper gehörte der Klasse IgG2a an und war über die Induktion von Ascites in Mäusen angereichert worden. Trotz aller Testverfahren ist es nicht mit Sicherheit auszumachen, ob der monoklonale Antikörper spezifisch gegen den Rezeptor gerichtet ist. Wie von einigen Autoren gezeigt wurde, können Antiseren mit Spezifität gegen verschiedene Membranantigene Fc-γ-Rezeptoren auf menschlichen, peripheren Blutlymphozyten blockieren (Sarmay, Sanderson und Ivanyi, 1979). Die von ihnen verwendeten Antiseren hatten Spezifität gegen $ß_2$-Mikroglobulin, Ia-Antigene oder Oberflächen-Immunglobuline. Durch Rosetten-Inhibitionsversuche konnten sie zeigen, daß alle Antiserum-Präparationen Rosettenbildung mit IgG-sensibilisierten Erythrozyten inhibieren konnten, wobei anti-$ß_2$-Mikroglobulin-Antikörper am aktivsten waren. $F(ab)_2$-Fragmente der Antikörper waren nur bei 37^{o} C, nicht bei 0^{o} C in der Lage, zu inhibieren. Zusatz von Cytochalasin (verhindert das Zusammenfließen von Rezeptoren = Capping) schaffte die Inhibitionswirkung von $F(ab)_2$-Fragmenten wieder ab. Die Autoren interpretierten ihre Ergebnisse mit zwei parallel zueinander verlaufenden Ereignissen:

1. Antiseren gegen Oberflächen-Immunglobuline, Ia-Antigene und $ß_2$-Mikroglobulin führen nach der Bindung zum "Capping", d. h. Zusammenfließen der Antigene. Dieser Prozeß findet nur bei 37^{o} C statt. Die Fc-Rezeptoren werden in diesen Prozeß miteinbezogen ("Cocapping"),wodurch sich ihre Zahl auf der Membran beträchtlich verringert. Resultat ist eine verringerte Ausbildung von Rosetten mit sensibilisierten Erythrozyten.
2. Der Fc-Teil des Antikörpers kann sich nach der Bindung des Fab-Teils an sein korrespondierendes Antigen an den benachbarten Fc-γ-Rezeptor binden und somit durch direkte Blockade inhibierend wirken. Zusätzlich findet vermutlich auch "Cocapping" des Rezeptors mit dem Membranantigen statt. Der Mechanismus der sterischen Inhibition kann nur wirksam sein, wenn a) die Bindung des Antikörpers an das Antigen stabil genug ist und b) das Antiserum von einer Spezies stammt, deren IgG sich an Fc-Rezeptoren der verwendeten Zellen binden kann.

Die Autoren zogen aus ihren Ergebnissen den Schluß, daß eine Inhibition der Bindung von IgG an Fc-Rezeptoren durch beliebige Antiseren gegen Membrandeterminanten erreicht werden kann.

Im Falle der hier isolierten monoklonalen Antikörper gegen Mastzellmembranen traf dies nicht zu, da in der Immunfluoreszenz positive Antikörper in den meisten Fällen im spezifischen ^{125}J-h.a.IgGa-Inhibitionstest nicht positiv waren. Dennoch sind die gerade beschriebenen Mechanismen bei den verwendeten anti-Fc-γ-Rezeptor-Antikörpern nicht auszuschließen.

Die Anreicherungsversuche des Fc-γ-Rezeptors waren alle negativ, obwohl eine Reihe verschiedener Techniken angewendet wurde:

1. Nach Bindung des Antikörpers an ^{125}J-markierte Mastzellen wurden die Zellen solubilisiert (1 % NP 40) und die Antikörper-Rezeptorkomplexe durch Protein A-Adsorption angereichert. Die Analyse dieser Komplexe in der SDS-PAGE zeigte keine Bande, die dem Rezeptor hätte zugeordnet werden können. Durch Untersuchungen von Kronvall, Grey und Williams (1970) ist gesichert, daß sich Mäuse-IgG2a an Protein A bindet. Aus diesem Ergebnis kann man daher nur schließen, daß das Fehlen einer nachweisbaren Komponente im SDS-Gel auf die Lösung der Antikörper-Rezeptorbindung zurückzuführen ist. Ursache hierfür könnte die Anwesenheit von Detergenz sein (NP 40).
2. Solubilisierter Mastzellextrakt wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch die Technik des "Western-Blot" auf einen Nitrozellulosefilter transferiert. Durch die nachfolgende immunologische Behandlung mit dem monoklonalen anti-Rezeptor-Antikörper und einem ^{125}J-markiertem anti-Maus-Ig-Antikörper konnte ebenfalls keine Komponente nachgewiesen werden, die der Antikörper erkennt. Im Unterschied zu Punkt 1. muß sich der Antikörper jedoch hier an durch SDS und Mercaptoäthanol denaturiertes Material binden. Falls wesentliche Strukturen des Rezeptors

durch Disulfidbrücken gebildet oder zusammengehalten werden, kann diese Zerstörung natürlich den Verlust der Antigenität bedeuten; der Antikörper kann den Rezeptor nun nicht mehr erkennen.

3. Solubilisierter Zellextrakt wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt und dann ähnlich wie beim "Western-Blot" behandelt, mit der wichtigen Ausnahme, daß der Transfer der Proteine auf den Nitrozellulosefilter wegfiel und dadurch die nachfolgenden Schritte im SDS-Gel stattfanden. Diese Versuche verliefen ebenfalls erfolglos.

Allen Methoden der Rezeptoranreicherung ist gemeinsam, daß sie in Anwesenheit von Detergenz (NP 40) oder SDS/Mercaptoäthanol stattfanden. Bei dem Isolierungsversuch mit der Protein-A-Methode (Kessler, 1975) ist NP 40 im Puffer enthalten, allerdings kein Mercaptoäthanol (es wird erst bei der Vorbereitung der Probe für die SDS-PAGE zugesetzt). Die beiden anderen Methoden wurden immer in Gegenwart von SDS und Mercaptoäthanol durchgeführt.

Wie schon in der Einleitung besprochen, wurde kürzlich die Lipidabhängigkeit des Fc-Rezeptors für IgG2b auf Mäusemakrophagen beschrieben (Anderson, 1980). Der vom Autor solubilisierte Rezeptorkomplex war nur unter Zusatz von Liposomen aktiv. Da es durchaus möglich ist, daß für die Funktionsfähigkeit des Fc-γ-Rezeptors auf Rattenmastzellen ein Lipidanteil nötig ist, könnte im Verlauf der analytischen Prozesse eine Trennung des Proteins- vom Lipidteil stattfinden. Diese Spaltung des Rezeptormaterials könnte dann zur Folge haben, daß der monoklonale Antikörper sein Antigen nicht mehr oder nicht mehr mit genügend hoher Affinität erkennt.

Wie Sandermann (1978) zeigt, existiert die Möglichkeit der Interaktion von Membranproteinen mit Lipiden durchaus. Die ß-Hydroxybutyratdehydrogenase z. B. verliert bei Extraktion mit Detergenz ihre Aktivität, gewinnt sie aber sofort zurück, wenn man Lecithine zusetzt. Ähnliche Mechanismen könnten

durchaus zum Mißlingen der Reinigungsversuche des Rezeptors beigetragen haben. Dazu müßte man allerdings fordern, daß entweder der Lipidteil ein Teil der antigenen Determinante darstellt, die der monoklonale Antikörper erkennt, oder daß durch die Anlagerung des Lipidteils der Proteinteil eine Konformationsänderung erfährt. Geht die so erreichte Konformation verloren, wie z. B. durch Solubilisierung, dann geht auch die antigene Wirkung verloren.

Zusammenfassend kann man sagen, daß wahrscheinlich die Solubilisierung mit NP 40 und/oder auch mit Mercaptoäthanol und SDS Strukturänderungen des Antigens (Fc-γ-Rezeptors ?) zur Folge haben, die dem Antikörper ein Erkennen unmöglich machen.

E.11. Zur Identität von Fc-ε - und Fc-γ-Rezeptor

Die Frage nach der Identität oder Nicht-Identität von IgE- und IgGa-Rezeptor kann durch die vorliegenden Experimente nicht eindeutig beantwortet werden. Die Anreicherungsversuche des Fc-γ-Rezeptors mit verschiedenen Methoden sollten hier Aufschluß geben; dies gelang nicht.

Einige der durchgeführten Versuche legen jedoch nahe, die beiden Rezeptoren als strukturell und funktionell verschiedene Membranareale zu betrachten. Die Ausbildung von Rosetten aus Mastzellen von normalen Tieren und solchen von Nip. bras. infizierten Tieren mit h.a.IgGa-bedeckten Schafserythrozyten zeigte keine quantitativen Unterschiede. Eine Besetzung der IgE-Rezeptoren mit IgE scheint also einer Bindung von IgGa nicht im Wege zu stehen.

Die Bindungsstudien bei verschiedenem pH des Mediums legen ebenfalls den Schluß nahe, daß der IgGa-Rezeptor nicht identisch ist mit demjenigen für das IgE. Während die Bindung von h.a.IgGa bei pH 5.5 - 6.4 um das fünf- bis sechsfache steigt, ist keine Veränderung der IgE-Bindung festzustellen (Abb. 14).

Die Daten der biologischen Experimente (Histaminsekretion und ^{45}Ca-Einstrom) zeigen, daß h.a.IgGa die IgE-vermittelte Mediatorensekretion modulieren kann, d. h. daß sich h.a.IgGa, wie schon durch die Rosetten- und Fluoreszenzversuche bewiesen, an IgE-besetzte Mastzellen binden kann und in der Folge zu einer Inhibition bzw. Steigerung der Histaminsekretion führt. Die funktionelle Verschiedenheit von IgGa und IgE spricht für nichtidentische Rezeptorstrukturen auf der Mastzellmembran.

Die Bindung von ^{125}J-markiertem IgE kann durch Vorinkubation der RBL-Zellen mit h.a.IgGa bis zu 50 % inhibiert werden. Dieses Resultat scheint für eine Identität von IgE- und IgGa-Rezeptor zu sprechen. Wie jedoch bereits diskutiert, gibt es auch andere Möglichkeiten der Interpretation, wie z. B. die passive Miteinbeziehung von IgE-Rezeptoren in die vom h.a.IgGa induzierte Membranbewegung, die durchaus zu einer Veränderung der IgE-Bindungsrate führen könnte.

Eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung über Fc-Rezeptoren für IgG auf RBL-Zellen (Segal, Sharrow, Jones und Siraganian, 1981) beschäftigt sich ebenfalls mit diesem Thema. Die Autoren konnten die Existenz eines Fc-Rezeptors für aggregiertes IgG durch Fluoreszenzuntersuchungen und radioaktive Bindungsversuche nachweisen. Sie beschrieben diesen Rezeptor als strukturell unabhängig vom IgE-Rezeptor. Die Bindung von IgE an seinen Rezeptor konnte durch IgG-Aggregate nicht inhibiert werden, d. h. aggregiertes IgG kann sich nicht an den IgE-Rezeptor binden. Im Gegensatz dazu war IgE jedoch in der Lage, sich in Form kleinerer Aggregate an den IgG-Rezeptor zu binden. Die Autoren konnten keinen Einfluß des IgG auf die IgE-vermittelte Histaminsekretion feststellen.

Die Unterschiede zwischen den gerade beschriebenen und den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen sich vermutlich dadurch erklären, daß Segal et al. nicht mit gereinigtem IgGa, sondern mit Ratten-IgG, das alle Subklassen

enthält, gearbeitet haben. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich reines IgGa benutzt, weil diese Subklasse des Ratten-IgG's der einzige IgG-Antikörper der Ratte ist, der als zytotrop beschrieben worden ist in der Literatur (siehe Einleitung).

E.12. Abschließende Bemerkungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Parameter der Bindung von h.a.IgGa und IgGa-Immunkomplexen an RBL-Zellen und Mastzellen untersucht. Der Einfluß verschiedener Faktoren auf das Bindungsverhalten des komplexierten Antikörpers konnte dargestellt werden. Es ergaben sich interessante Feststellungen, wie z. B. die veränderte Bindungsrate bei saurem pH, die weitreichende Schlußfolgerungen über die Rolle des IgGa bei der allergischen Reaktion vom Soforttyp zulassen. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Untersuchungen zur biologischen Funktion des IgGa bezüglich der Mediatorensekretion im Verlauf der allergischen Entzündung ergibt sich ein recht vielfältiges Bild der Aufgaben dieses zytotropen Antikörpers. IgGa ist ein zytotroper Antikörper, d. h. er kann sich über sein Fc-Stück an spezielle Rezeptoren auf Mastzellen und basophilen Leukozyten binden. Das IgGa als monomerer Antikörper bindet sich zumindest in vitro nicht nachweisbar an die Zellen. Hierzu ist es aber in der Lage, wenn es durch Bindung an Antigene in Immunkomplexe überführt wird. Die Affinität der Bindungsreaktion ist hierbei umso größer, je mehr Fc-Stücke in den Immunkomplexen zur Bindung zur Verfügung stehen.

Werden sensibilisierte Mastzellen oder basophile Leukozyten durch das Eindringen von Antigen in den Organismus aktiviert, kommt es zu einem Absinken des pH-Wertes in der Umgebung. Dies führt dazu, daß IgGa-Immunkomplexe sich verstärkt an Mastzellen und Basophile binden. Es ist durchaus möglich,

daß die Mediatoren mit permeabilitätssteigender Wirkung auf die Gefäße den Übertritt von IgGa-Antikörpern (und anderen) aus der Blutzirkulation ins umliegende Gewebe ermöglichen.

IgGa-Immunkomplexe können die Reaktionsbereitschaft der Mastzellen und basophilen Leukozyten erniedrigen oder unter bestimmten Bedingungen (konzentrationsabhängig) auch erhöhen. Die alternative Wirkung hängt nicht nur von der Konzentration des Antigens ab, welche der Auslöser der Überempfindlichkeitsreaktion ist. Im Falle einer optimalen Aktivierungssituation, d. h. optimalen Konzentrationsverhältnissen von IgE-Molekülen auf der Zelle und Antigenmolekülen, inhibieren IgGa-Immunkomplexe die Mediatorensekretion, während sie unter suboptimalen Bedingungen auch verstärkend wirken können.

Es scheint, daß die Vorgänge bei der Typ I-Reaktion sehr komplex sind. Die Bereitschaft eines Organismus, auf ein Antigen allergisch zu reagieren, hängt nicht allein vom Ausmaß der IgE-Antikörperbildung ab. Die Konzentration des bei der Immunantwort gebildeten IgGa's spielt eine große Rolle. Wie schon in der Einleitung beschrieben, gibt es noch andere Faktoren, die regulativen Einfluß ausüben können, z. B. den in unserem Labor beschriebenen Hemmfaktor (Theobald und König, 1981). Die Autoren zeigen, daß dieser Faktor je nach Konzentration als Inhibitor oder Verstärker der Überempfindlichkeitsreaktion wirken kann.

Es wäre sehr interessant, vor allem für die innere Medizin, zu untersuchen, ob der zytotrope IgG-Antikörper des Menschen, das IgG_4, eine vergleichbare Wirkung hat wie das IgGa der Ratte. Vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, würde dies einen weiteren Schritt zum Verständnis der pathophysiologischen Rolle von Immunkomplexen bedeuten.

F. Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, daß Rattenmastzellen und Rattenbasophile Leukämiezellen (RBL-Zellen) Rezeptoren für das Fc-Stück des Ratten-IgGa besitzen, sogenannte Fc-γ-Rezeptoren. Schafserythrozyten, an deren Zelloberfläche mit Hilfe von $CrCl_3$ hitzeaggregiertes IgGa gekuppelt wurde, zeigten signifikante Rosettenbildung mit Mastzellen (48 %) und RBL-Zellen (10.5 %). Bemerkenswert ist, daß Mastzellen von Nip. bras. infizierten Ratten ebenso viele Rosetten bildeten wie normale Mastzellen, obwohl ihre Oberfläche in hohem Maß mit IgE besetzt ist. Fluoreszenzserologische Untersuchungen ergaben das gleiche Bild.

Um exakte Bindungsparameter zu erhalten, wurden ^{125}J-markierte Hitzeaggregate (10 - 130 S) und Immunkomplexe (22 - 132 S) definierter Größe aus IgGa bzw. IgGa-anti-HSA hergestellt. Die Bindung von h.a.IgGa und IgGa-Immunkomplexen erwies sich als abhängig von der Zeit, Temperatur, Calcium-Konzentration des Mediums, dem pH und der Zahl der pro Molekül verfügbaren Fc-Stücke. Die Bindung verlief bei 37° C schneller und effektiver als bei 0° C und zeigte ein Optimum bei einer Calcium-Konzentration des Mediums von 0.3 mM. Bei einem pH von 5.5 - 6.4 war die Bindungsrate von h.a.IgGa an RBL-Zellen 5 - 6 mal so hoch wie bei pH 7.4, im alkalischen Bereich war sie bis zu 75 % erniedrigt. Mastzellen zeigten eine Steigerung der Bindungsrate um ca. 60 % bei saurem pH. Die Bindungsrate von Immunkomplexen an RBL-Zellen verdoppelte sich bei pH 6.4.

Die Affinität der Bindung stieg mit der Zahl der verfügbaren Fc-Stücke. So wurden für h.a.IgGa (10 - 130 S) Bindungsraten zwischen 3.75 und 18 % gemessen und für Immunkomplexe (22 - 132 S) zwischen 8.3 und 20.1 %.

Die Rezeptor-Liganden-Bindung konnte durch Vorinkubation von h.a.IgGa mit Protein A teilweise gehemmt werden (13 - 27 %).

Die Bindung von ^{125}J-h.a.IgGa wurde durch hohe Dosen kalten h.a.IgGa's um 28 % inhibiert, bei niedrigen Dosen stieg die Bindungsrate um 54 %.

Hitzeaggregiertes IgGa inhibierte dosisabhängig die Bindung von ^{125}J-IgE (bis zu 50 %), führte in bestimmten Konzentrationsbereichen jedoch auch zu einer Steigerung (ca. 30 %). Bereits gebundenes IgE wurde durch Inkubation mit h.a.IgGa teilweise wieder entfernt.

H.a.IgGa stabilisiert normale Mastzellen und RBL-Zellen. Der Einstrom von ^{45}Ca-Ionen in die Zellen und die Histaminsekretion sind gegenüber unbehandelten Zellen leicht vermindert. Hitzeaggregiertes IgGa kann die IgE-vermittelte Histaminsekretion und den Ca^{++}-Einstrom an sensibilisierten Mastzellen dosisabhängig unterdrücken oder fördern. Mit hohen Konzentrationen konnte eine Hemmung um 80 - 90 % erzielt werden, mit niedrigen Konzentrationen in Abhängigkeit vom Senisibilisierungsgrad der Zellen eine leichte bis mehrfache Steigerung.

Es wurde mit verschiedenen Methoden versucht, den Fc-γ-Rezeptor anzureinigen und sein Molekulargewicht in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zu bestimmen.

1. ^{125}J-markierte Zellen wurden mit h.a.IgGa inkubiert. Nach Solubilisierung mit NP 40 (1 %) wurden eventuell vorhandene h.a.IgGa-Rezeptorkomplexe mit anti-IgGa präzipitiert. Im SDS-Gel waren jedoch keine Komplexe nachweisbar.

2. Es wurden monoklonale Antikörper von der Maus gegen den Fc-γ-Rezeptor durch Fusion von Milzzellen immunisierter Balb/c-Mäuse mit Plasmozytomzellen (NS I) hergestellt. Die gewonnenen Antikörper der Klasse IgG2a waren positiv in der indirekten Immunfluoreszenz mit Mastzellen und RBL-Zellen; sie reagierten im ELISA mit RBL- und Mastzellhomogenat und inhibierten die Bindung von ^{125}J-h.a.IgGa (76 S) bis zu 35 %. Diese Antikörper wurden zur weiteren Charakterisierung des Fc-Rezeptors verwendet, durch

a) Inkubation ^{125}J-oberflächenmarkierter Zellen mit den anti-Fc-γ-Rezeptor-Antikörpern. Solubilisierung mit NP 40 (1 %) und Präzipitation der Antikörper-Rezeptorkomplexe mit Protein A (Staphylococcus aureus) führte zu keiner sichtbaren Anreicherung des Rezeptors im SDS-Polyacrylamidgel.

b) den "Western-Blot" (Towbin, Staehelin und Gordon, 1979). Mastzellsolubilisat wurde im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine durch elektrophoretischen Transfer auf Nitrozellulose überführt. Durch die nachfolgende immunologische Behandlung mit anti-Fc-γ-Rezeptor und ^{125}J-anti-Maus-Ig konnte allerdings keine spezifische Bande dargestellt werden.

c) Auftrennung von Mastzellsolubilisat in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und nachfolgende Behandlung des Gels mit monoklonalem anti-Fc-γ-Rezeptors und ^{125}-J-anti-Maus-Ig. Auch dieser Versuch war nicht erfolgreich.

G. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abramson N., Gelfand E. W., Jandl J. H. & Rosen F. S. (1970) The interaction between human monocytes and red cells. J. Exp. Med. 132, 1207.

2. Alexander M. D., Andrews J. A., Leslie R. G. Q. & Wood N. J. (1978) The binding of human and guinea-pig IgG subclasses to homologous macrophage and monocyte Fc-receptors. Immunology 35, 115.

3. Anderson C. L. (1980) The murine macrophage Fc-receptor for IgG2b is lipid dependent. J. Immunol. 125, 538.

4. Arend W. P. & Mannik M. (1972) In vitro adherence of soluble immune complexes to macrophages. J. Exp. Med. 136, 415.

5. Arend W. P. & Mannik M. (1971) Studies on antigen-antibody complexes II. Quantitation of tissue uptake of soluble complexes in normal and complement depleted rabbits. J. Exp. Med. 107, 63.

6. Austen K. F. & Orange R. P. (1975) Chemical mediators in bronchial asthma: the possible role of the chemical mediators of immediate hypersensitivity in pathogenesis of subacute chronic disease. Am. Rev. Respir. Dis. 112, 423

7. Bach M. K., Bloch K. J. & Austen K. F. (1971) IgE and IgGa antibody mediated release of histamine from rat peritoneal cells I. Optimum conditions for in vitro preparation of target cells with antibody and challenge with antigen. J. Exp. Med. 133, 752.

8. Bach M. K., Bloch K. J. & Austen K. F. (1971) IgE and IgGa antibody mediated release of histamine from rat peritoneal cells II. Interaction of IgE and IgGa at the target cell. J. Exp. Med. 133, 772.

9. Basten A., Miller J. F. A., Sprent J. & Pye J. (1972a) receptor for antibody on B lymphocytes I. Method of detection and functional significance. J. Exp. Med. 135, 61

10. Basten A., Warner N. L. & Mandel T. (1972 b) A receptor for antibody on B lymphocytes II. Immunochemical and electron microscopy characteristics. J. Exp. Med. 135, 627.

11. Bayer A. S., Theofilopoulos A. M., Eisenberg R., Dixon F. J. & Guze L. B. (1976) Circulating immune complexes in infective endocarditis. New. Engl. J. Med. 295, 1500.

12. Bazin H., Querinjean P., Beckers A., Heremans J. F. & Dessy F. (1974) Transplantable immunoglobulin-secretory tumors in rats IV. Sixty three IgE secreting immunocytoma tumors. Immunology 26, 713.

13. Benacerraff B., Sebestyen M. & Cooper N. S. (1959) The clearance of antigen-antibody complexes from the blood by the reticulo-endothelial system. J. Immunol. 82, 131.

14. Bianco C., Griffin F. M. & Silverstein S. C. (1975) Studies on the macrophage complement receptors. J. Exp. Med. 141, 1278.

15. Bjork I., Petersson B.-A. & Sjöquist J. (1972) Some physiochemical properties of protein A from Staphylococcus aureus. Eur. J. Biochem. 29, 579.

16. Bourgeois A., Abney E. R. & Parkhouse R. M. E. (1977) Structure of mouse Fc-receptor. Eur. J. Immunol. 7, 691.

17. Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248.

18. Braunsberg H. & Hammond K. D. (1979) Methods of steroid receptor calculation: and interlaboratory study. J. Ster. Biochem. 11, 1561.

19. Brown J. C., Harris M., Papamichail M., Sljivic V. S. & Holborow E. J. (1973) The localization of aggregated human γ-globulin in the spleens of normal mice. Immunology 24, 955.

20. Burchiel S. W. & Warner N. L. (1980) Cyclic AMP modulation of Fc-receptor expression on a pre-B-cell lymphoma. J. Immunol. 124, 1016.

21. Burridge K. (1976) Changes in cellular glycoproteins after transformation: identification of specific glycoproteins and antigens in sodium dodecyl sulfate gels. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73, 4457.

22. Capron A., Dessaint J. P., Joseph M., Rousseax R., Capron M. & Bazin H. (1977) Interaction between IgE complexes and macrophages in the rat: a new mechanism of macrophage activation. Eur. J. Immunol. 7, 315.

23. Chamness G. C. & Mc Guire W. L. (1975) Scatchard plots: common errors in correction and interpretation. Steroids 26, 538.

24. Christian C. L. (1960) Studies of aggregated γ-globulin I. Sedimentation, electrophoretic and anticomplementary properties. J. Immunol. 84, 112.

25. Cochrane C. G. & Koffler D. (1973) Immune complex disease in experimental animals and man. Adv. Immunol. 16, 185.

26. Cochrane C. G. & Müller-Eberhard H. J. (1968) The derivation of two distinct anaphylatoxin activities from the third and fifth components of human complement. J. Exp. Med. 127, 371.

27. Conrad D. H. & Froese A. (1976) Characterization of the target cell receptor for IgE II. Polyacrylamide gel analysis of the surface IgE-receptor from normal rat mast cells and from rat basophilic leukemia cells. J. Immunol. 116, 319.

28. Conrad D. H. & Froese A. (1978) Characterization of the target cell receptor for IgE III. Properties of the receptor isolated from rat basophilic leukemia cells by affinity chromatography. J. Immunol. 120, 429.

29. Conroy M. C., Adkinson N. F. jr. & Lichtenstein L. M. (1977) Measurement of IgE on human basophils: relation to serum IgE and anti-IgE-induced histamine release. J. Immunol. 118, 1317.

30. Coombs. R. R. A. & Gell P. G. H. (1975) Classification of allergic reactions responsible for clinical hyersensitivity and disease. In: Clinical aspects of immunology, S. 761. Gell P. G. H., Coombs R. R. A. & Lachmann P. J. (Hrsg.), Blackwell publications.

31. Cooper N. R. (1969) Immune adherence by the fourth component of complement. Science 165, 396.

32. Cooper S. M., Sambray Y. & Friou G. J. (1977) Isolation of separate Fc-receptors for IgG complexed to antigen and native IgG from a murine leukemia, Nature 270, 253.

33. Coutts S. M., Nehring R. E. jr. & Jariwala N. U. (1980) Purification of rat peritoneal mast cells: occupation of IgE-receptors by IgE prevents loss of the receptors. J. Immunol. 124, 2309.

34. Cowdery J. S. jr., Treadwell P. E. & Fritz R. B. (1975) A radioimmunoassay for human antigen-antibody complexes in clinical material. J. Immunol. 114, 5.

35. Cuatrecasas P. (1970) Protein purification by affinity chromatography. J. Biol. Chem. 245, 3059.

36. Cunningham-Rundles C., Siegal F. P. & Good R. A. (1978) Isolation and characterization of a human monuclear cell Fc-receptor. Immunochemistry 15, 365.

37. Daeron M., Prouvost-Danon & Voisin G. A. (1980) Mast cell membrane antigens and Fc-receptors in anaphylaxis II. Functionally distinct receptors for IgG and IgE on mouse mast cells. Cell. Immunol. 49, 178.

38. Daeron M. & Voisin G. A. (1979) Mast cell membrane antigens and Fc-receptors in anaphylaxis I. Products of the major histocompatibility complex involved in alloantibody-induced mast cell activation. Immunology 38, 447.

39. Dessaint J. P., Capron A., Joseph M. & Bazin H. (1979) Cytophilic binding of IgE to the macrophage II. Immunological release of lysosomal enzyme from macrophages by IgE and anti-IgE in the rat: a new mechanism of macrophage activation. Cell. Immunol. 46, 24.

40. Dezsö B. & Foris G. (1981) Effect of Angiotensin II on the Fc-receptor activity of rat macrophages. Immunology 42, 277.

41. Diamond B., Bloom B. R. & Scharff M. D. (1978) The Fc-receptors of primary and cultured phagocytic cells studied with homogenous antibodies. J. Immunol. 121, 1329.

42. Dickler H. B. (1974) Studies of the human lymphocyte receptor for heat-aggregated or antigen-complexed immunoglobulin. J. Exp. Med. 140, 508.

43. Dickler H. B. (1976) Lymphocyte binding of aggregated immunoglobulin. Scand. J. Immunol. 5, 91.

44. Dorrington K. J. (1976) Properties of the Fc-receptor on macrophages and monocytes. Immunological Communications 5, 263.

45. Dorrington K. J. & Bennich H. (1978) Structure-function relationship in human immunoglobulin E. Immunol. Rev. 41, 1

46. Dorrington K. J. & Bennich H. (1973) Thermally induced structural changes in IgE. J. Biol. Chem. 248, 8378.

47. D'Urso-Coward M. & Cone R. E. (1978) Membrane proteins of the P388D1 macrophage cell line: isolation of membrane polypeptides that bind to the Fc-portion of aggregated IgG. J. Immunol. 121, 1973.

48. Ehlenberger A. G. & Nussenzweig V. (1977) The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. J. Exp. Med. 145, 357.

49. Fewtrell C. & Metzger H. (1980) The role of aggregation in the function of the IgE Fc-receptor. J. Retic. Soc. 28, 35.

50. Foreman J. D., Hallett M. B. & Mongar J. L. (1977) The relationship between histamine secretion and ^{45}calcium uptake by mast cells. J. Physiol. (London) 271, 193.

51. Foreman J. C., Mongar J. L. & Gomperts B. D. (1973) Calcium ionophores and movement of calcium ions following the physiological stimulus to a secretory process. Nature 248, 249.

52. Frade R. & Kourilsky F. M. (1977) Preliminary characterization of a glycoprotein having Fc-receptor properties extracted from a T cell lymphoma (L-5178-Y). Eur. J. Immunol. 7, 663.

53. Fridman W. H., Gresser I., Bandu M. T., Agnet M. & Neauport-Sautes C. (1980) Interferon enhances the expression of Fc-γ-receptors. J. Immunol. 124, 2436.

54. Fritsche R. & Spiegelberg H. L. (1978) Fc-receptors for IgE on normal rat lymphocytes. J. Immunol. 121, 471.

55. Froese A. (1980) The presence of two kinds of receptors for IgE on rat mast cells. J. Immunol. 125, 981.

56. Goldberg N. D. (1975) Cyclic nucleotides and cell function. In: Cell membranes: biochemistry, cell biology and pathology. Weissmann G. & Clairborne R. (Hrsg.), H. P. Publications, New York.

57. Haakenstad A. O. & Mannik M. (1977) The biology of immune complexes. In: Autoimmunity, Kapitel II, S. 227, Tatal N. (Hrsg.) Academic press, New York.

58. Haakenstad A. O. & Mannik M. (1974) Saturation of the reticulo-endothelial system with soluble immune complexes. J. Immunol. 112, 1939.

59. Haegert D. G., Hallberg T. & Coombs. R. R. A. (1974) B and T lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. Int. Archs Allergy appl. Immunol. 46, 525.

60. Halper J. & Metzger H. (1976) The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells-IV. Inhibition by IgGa immune complexes. Immunochemistry 13, 907.

61. Handwerger B. S. & Koren H. S. (1976) The nature of the effector cell in antibody-dependent, cell mediated cytolysis (ADCC): the cytotoxic activity of murine tumor cells and peritoneal macrophages. Clin. Immunol. Immunopath. 5, 272.

62. Hay F. C., Torrigiani G. & Roitt I. M. (1972) The binding of human IgG subclasses to human monocytes. Eur. J. Immunol. 2, 257.

63. Heidelberger M. & Kendall F. E. (1935) Continued quantitative theory of precipitin reaction: reaction between crystalline egg albumine and its homologous antibody. J. Exp. Med. 62, 697.

64. Heidelberger M. & Pedersen K. O. (1937) The molecular weight of antibodies. J. Exp. Med. 65, 393.

65. Hempstead B. L., Parker C. W. & Kulczycki A. jr. (1979) Characterization of the IgE receptor isolated from human basophils. J. Immunol. 123, 2283.

66. Henson P. M. (1974) Complement-dependent platelet and polymorphnuclear leucocyte reactions. Transpl. Proc. VI, 27.

67. Henson P. M. & Spiegelberg H. L. (1973) Release of serotonin from human platelets induced by aggregated immunoglobulins of different classes and subclasses. J. Clin. Invest. 52, 1282.

68. Heusser C. H., Anderson C. L. & Grey H. M. (1977) Receptors for IgG: subclass specificity of receptors on different mouse cell types and the definition of two distinct receptors on a macrophage cell line. J. Exp. Med. 145, 1316

69. Holgate S., Winslow C., Lewis R. & Austen K. F. (1981) Differential activation of cyclic AMP-dependent protein kinase (cAPK) in rat serosal mast cells (RSMC). Fed. Proc. 40, 4758.

70. Huber H., Douglas S. D. & Fudenberg H. H. (1969) The IgG receptor: an immunological marker for the characterization of mononuclear cells. Immunology 17, 7.

71. Isersky C., Kulczycki A. jr. & Metzger H. (1974) Isolation of IgE from reaginic rat serum. J. Immunol. 112, 1901.

72. Isersky C., Taurog J. D. Poy G. & Metzger H. (1978) Triggering of cultured neoplastic mast cells by antibodies to the receptor for IgE. J. Immunol. 121, 549.

73. Ishizaka K. (1963) Gamma globulin and molecular mechanisms of hypersensitivity reactions. Prog. Allergy 7, 32.

74. Ishizaka K. (1976) Cellular events in the IgE antibody response. Adv. Immunol. 23, 1.

75. Ishizaka T., Chang T. H., Taggart M. & Ishizaka K. (1977) Histamine release from rat mast cells by andibodies against rat basophilic leukemia cell membranes. J. Immunol. 119, 1589.

76. Ishizaka K. & Ishizaka T. (1960) Biolocic activity of aggregated γ-globulin II. A study of various methods for aggregation and species differences. J. Immunol. 85, 163.

77. Ishizaka K. & Ishizaka T. (1969) Immune mechanisms of reversed type reaginic hypersensitivity. J. Immunol. 103, 588.

78. Ishizaka K. & Ishizaka T. (1978) Mechanisms of reaginic hypersensitivity and IgE antibody response. Immunolog. Rev. 41, 109.

79. Ishizaka T. & Ishizaka K. (1974) Mechanisms of passive sensitization IV. Dissociation of IgE molecules from basophil receptors at acid pH. J. Immunol. 112, 1078.

80. Ishizaka T. & Ishizaka K. (1975) Biology of immunoglobulin E. Molecular basis of reaginic hypersensitivity. Prog. Allergy 19, 60.

81. Ishizaka T. & Ishizaka K. (1978) Triggering of histamine release from rat mast cells by divalent antibodies against IgE receptors. J. Immunol. 120, 800.

82. Ishizaka T., Ishizaka K., Conrad D. H. & Froese A. (1978) A new concept of triggering mechanisms of IgE-mediated histamine release. J. Allergy Clin. Immunol. 61, 320.

83. Ishizaka K., Ishizaka T. & Hornbrook M. M. (1966) Physicochemical properties of human reaginic antibody IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. J. Immunolog. 97, 75.

84. Ishizaka K., Ishizaka T. & Lee E. H. (1970) Biologic function of the Fc-fragments of E-myeloma protein. Immunochemistry 7, 687.

85. Ishizaka T., König, W. Kurata M., Mauser L. & Ishizaka K. (1975) Immunologic properties of mast cells from rats infected with Nippostrongylus brasiliensis. J. Immunol. 115, 1078.

86. Itoh K. & Kumagai K. (1980) Effect of tunicamycin and neuraminidase on the expression of Fc-IgM and -IgG receptors on human lymphocytes. J. Immunol. 124, 1830.

87. Jasani B. & Stanworth D. R. (1973) Studies on the mast cell triggering action of certain artificial histamine liberators. Int. Archs Allergy 45, 74.

88. Jewell D. P. & Mc Lennan I. C. M. (1973) Circulating immune complexes in inflammatory bowel disease. Clin. Exp. Immunol. 14, 219.

89. Johansson S. G. O. & Bennich H. (1967) Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. Immunology 13, 381.

90. Kahn-Perles B., Siré J., Boned A. & Bourgois A. (1980) Putative conformation of mouse Fc-γ-receptor. J. Immunol. 125, 1360.

91. Kearney J. F., Radbruch A., Liesengang B. & Rajewski K. (1979) A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. J. Immunol. 123, 1548.

92. Keller R. (1973) Concanavalin A, a model "antigen" for the in vitro detection of cell bound reaginic antibody in the rat. Clin. Exp. Immunol. 13, 139.

93. Kepron M. R., Conrad D. H. & Froese A. (1981) The cross-reactivity of rat IgE and IgG with solubilized receptors of rat basophilic leukemia cells. Fed. Proc. 40, 4179.

94. Kerbel R. S. & Davies A. J. (1974) The possible biological significance of Fc-receptors on mammalian lymphocytes and tumor cells. Cell 3, 105.

95. Kessler S. W. (1975) Cell membrane antigen isolation using the staphylococcal protein A-antibody adsorbent. J. Immunol. 115, 1617.

96. Kijlstra A., Daha M. R. & van Es L. (1979) Immune complexes in experimental glomerulonephritis. Behring Inst. Mitt. 64, 45.

97. Kijlstra A., Knutson D. W., Daha M. R. & van Es L. (1978 a) Clearance and glomerular localization of well defined immune complexes. In: Protides of the Biological Fluids, Peters H. (Hrsg.), Pergamon Press, Oxford.

98. Kijlstra A., Knutson D. W., Daha M. R. & van Es L. A. (1978b) Glomerular localization of well defined immune complexes. Fed. Proc. 37, 1291.

99. Kijlstra A., van der Lelij A., Knutson D., Fleuren G. J. & van Es L. A. (1978) The influence of phagocyte function on glomerular localization of aggregated IgM in rats. Clin. Exp. Immunol. 32, 207.

100. Kijlstra A., Lentz H. & van Es L. A. (1979) Isolation of stable aggregates of IgG by zonal ultracentrifugation in sucrose gradients containing albumin. Immunological Communications 8, 337.

101. Klein M., Neauport-Sautes C., Ellerson J. R. & Fridman W. H. (1977) Binding sites of human IgG subclasses and their domains for Fc-receptors of activated mureine T-cells. J. Immunol. 119, 1077.

102. Klinman N. R. & Taylor R. B. (1969) General methods for the study of cells and serum during the immune response: the response to dinitrophenyl in mice. Clin. Exp. Immunol. 4, 473.

103. Knutson D. W., Kijlstra A. & van Es L. A. (1977) Association and dissociation of aggregated IgG from rat peritoneal macrophages. J. Exp. Med. 145, 1368.

104. Köhler G. (1979) Soft agar cloning of lymphoid tumor lines. Detection of hybrid clones with anti-SRBC activity. In: Immunological Methods, Levkovits J. & Pernis B. (Hrsg.), Academic Press, S. 397.

105. Köhler G., Howe S. C. & Milstein C. (1976) Fusion between immunoglobulin secreting and non-secreting myeloma cell lines. Eur. J. Immunol. 6, 292.

106. Kölsch, E., Oberbarnscheidt J., Brüner K. & Heuer J. (1980) The Fc-receptor: its role in the transmission of differentiation signals. Transpl. Rev. 49, 61.

107. König, W. (1977) Studien zur membranbiologischen Grundlage der Sensibilisierung. Habilitationsschrift, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.

108. König W. (1979) Immunologische Grundlagen der Allergologie. Allergologie 2, 223.

109. König W. & Henn H. W. (1979) On the latency period of sensitization: inhibition of passive cutaneous anaphylaxis by a factor in normal rat serum. Int. Archs Allergy appl. Immunol. 58, 182.

110. König W., Henn H. W. & Stockinger H. (1978) Die membranbiologische Grundlage der Sensibilisierung. Verh. Dtsch. Ges. Path. 62, 245.

111. König W. & Ishizaka K. (1974) Association of receptors for mouse IgE with the plasma membrane of rat mast cells. J. Immunol. 113, 1237.

112. König W. & Ishizaka K. (1976) Binding of rat IgE with the subcellular components of normal rat mast cells. Immunochemistry 13, 345.

113. König W., Möller G. & Theobald K. (1979) Immunologische Parameter der Typ I und II Reaktionen. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 85. Band, 1467.

114. König W., Okudeira H. & Ishizaka K. (1974) Specific binding of mouse IgE with rat mast cells. J. Immunol. 112, 1652.

115. König W., Pfeiffer P., Szperalski B. & Bohn A. (1981) Membrane biochemical events in mast cell and basophil activation and secretion. Behring Inst. Mitt. (im Druck).

116. Kofler R. & Wick G. (1977) Some methodological aspects of the chromium chlorid method for coupling antigen to erythrocytes. J. Immunol. Meth. 16, 201.

117. Kronvall G., Grey H. M. & Williams R. C. jr. (1970) Protein A reactivity with mouse immunoglobulins. Structural relationship between some mouse and human immunoglobulins. J. Immunol. 105, 1116.

118. Kronvall G., Seal U., Finstad J. & Williams R. C. jr. (1970) Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc-fragment of γ-globulin using staphylococcal protein A. J. Immunol. 104, 140.

119. Kulczycki A. jr., Hempstead B. H., Hofmann S. L., Wood E. W. & Parker C. W. (1979) The cell surface receptor for immunoglobulin E II. Properties of the purified biologically active receptor. J. Biol. Chem. 254, 3194.

120. Kulczycki A. jr., Isersky C. & Metzger H. (1974) The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells I. Evidence for specific binding of IgE. J. Exp. Med. 139, 600.

121. Kulczycki A. jr., Mc Nearney T. A. & Parker C. W. (1976) The rat baspphilic leukemia cell receptor for IgE I. Characterization as a glycoprotein. J. Immunol. 117, 661.

122. Kulczycki A. jr. & Parker C. W. (1979) The cell surface receptor for immunoglobulin E. 1. The use of repetitive affinity chromatography for the purification of a mammalian receptor. J. Biol. Chem. 254, 3187.

123. Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. Nature 227, 680.

124. Lambert P. H. (1979) Problems with the detection of immune complexes. Behring Inst. Mitt. 64, 4.

125. Lancet D., Isenman D., Sjödahl J., Sjöquist J. & Pecht I. (1978) Interactions between staphylococcal protein A and immunoglobulin domains. Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 608.

126. Lane D. P. & Hoeffler W. K. (1980) SV 40 large T shares an antigenic determinant with a cellular protein of molecular weight 68.000. Nature 288, 167.

127. Levine B. B. (1965) The nature of the antigen-antibody complexes which initiates anaphylactic reactions II. The effect of molecular size on the abilities of homologous multivalent benzylpenicilloyl haptens to evoke PCA and passive Arthus reactions in the guinea pig. J. Immunol. 94, 121.

128. Lichtenstein L. M. & Gillespie E. (1973) Inhibition of histamine release by histamine controlled by H_2-receptors. Nature 244, 287.

129. Littlefield J. W. (1964) Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science 145, 709.

130. Loube S. R., Mc Nabb T. C. & Dorringten K. J. (1978) Isolation of an Fc-γ-binding protein from the cell membrane of a macrophage-like cell line (P 388 D1) after detergent solubilization. J. Immunol. 120, 709.

131. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. & Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265.

132. Lustig H. J. & Bianco C. (1976) Antibody-mediated cell cytotoxicity in a defined system: regulation by antigen, antibody and complement. J. Immunol. 116, 253.

133. Mc Lennan J. C. M. (1972) Competition for receptors for immunoglobulin on cytotoxic lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 10, 275.

134. Mc Lennan J. C. M. (1972) Antibody in the induction and inhibition of lymphocyte cytotoxicity. Transpl. Rev. 13, 67.

135. Magro A. M. (1974) Involvement of IgE in Con A-induced histamine release from human basophils in vitro. Nature 249, 572.

136. Maizel J. V. jr. (1971) Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. In: Methods in Virology, Maramorosch K. & Koprowski H. (Hrsg.), Academic Press, New York, Vol. 5, 179.

137. Mauer M. S., Fish A. J., Blau E. B. & Michael A. F. (1972) The glomerular mesangium I. Kinetic studies of macromolecular uptake in normal and nephrotic rats. J. Clin. Invest. 51, 1092.

138. Mc Even C. R. (1967) Tables for estimating sedimentation through linear concentration gradients of sucrose solution. Anal. Biochem. 20, 114.

139. Mc Nabb T., Koh T. Y., Dorrington K. J. & Painter R. H. (1976) Structure and function of immunoglobulin domains V. Binding of immunoglobulin G and fragments to placental membrane preparations. J. Immunol. 117, 882.

140. Menke G. C., Magro A. M., Lawrence D. A. & Spiegelberg H. L. (1978) Characterization of an IgE-receptor from cultured B-type lymphoblastoid cells. J. Immunol. 121, 1321

141. Messner R. P. & Jelinek J. (1970) Receptors from human γG globulin on human neutrophils. J. Clin. Invest. 49, 216

142. Metzger H. (1977) The cellular receptor for IgE. In: Receptors and Recognition, Series A, Vol 4, S. 75, Cuatrecasas P. & Greaves M. F. (Hrsg.), Chapman and Hall, London.

143. Mishell B. B. & Shiigi S. M. (1980) Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman & Company.

144. Molenaar J. L., van Galen M., Hannema A. L., Zeijlemaker W. & Pondman K. W. (1977) Spontaneous release of Fc-receptor-like material from human lymphoblastoid cell lines. Eur. J. Immunol. 7, 230.

145. Morrison M. & Bayse G. S. (1970) Catalysis of iodination by lactoperoxidase. Biochemistry 9, 2995.

146. Morris I. G. (1978) The receptor hypothesis of protein ingestion. In: Antigen absorption by the gut, W. A. Hemmings (Hrsg.), MTP, Lancaster, S. 3.

147. Morris I. G. (1980) An immunofluorescence study of IgG receptors in rodent enterocytes. Immunology 40, 273.

148. Morsett C., Bloch K. J. & Austen K. F. (1968) Biologic properties of rat antibodies II. Time course of appearance of antibodies involved in antigen-induced release of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A); association J. Immunol. 101, 658.

149. Mossmann H., Lauer W., Vortisch U., Günther E., Bazin H. & Hammer D. K. (1976) Stimulation and suppression of rat mast cell functions by alloantibodies. Eur. J. Immunol. 6, 591.

150. Mossmann, H., Schmitz B., Lauer W., Stauffer U., Gehrung M., Günther E. & Hammer D. K. (1979) Relationship between histocompatibility antigens, other surface determinants and the IgE receptor on rat mast cells. Eur. J. Immunol. 9, 219.

151. Nydegger U. E., Lambert P. H., Gerber H. & Miescher P. A. (1974) Circulating immune complexes in the serum in systemic lupus erythematosus and in carriers of hepatitis B-antigen. Quantitation by binding to radiolabelled C1q. J. Clin. Invest. 54, 297.

152. Oberbarnscheidt J. & Kölsch,E. (1978) Direct blockade of antigen-reactive B lymphocytes by immune complexes. An "off" signal for precursors of IgM-producing cells provided by the linkage of antigen- and Fc-receptors. Immunology 35, 151.

153. Ogawa M, Kochwa S., Smith C., Ishizaka K. & Mc Intyre O. R. (1969) Clinical aspects of IgE myeloma. N. Engl. J. Med. 218, 1217.

154. Ogilvie B. M. & Jones V. E. (1973) Immunity in the parasitic relationship between helminths and hosts. Prog. Allergy 17, 93.

155. Ogilvie B. M., Love R. J., Jarra W. & Brown K. N. (1977) Nippostrongylus brasiliensis infection in rats. The cellular requirement for worm expulsion. Immunology 32, 521.

156. Ouchterlony Ö. (1962) Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. In: Progress in Allergy, Vol. VI, S. 30.

157. Ouchterlony,Ö. (1958) Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. In: Progress in Allergy, Vol.V, S. 1.

158. Paraskevas F., Lee S. T., Orr K. B. & Israels L. G. (1972) A receptor for Fc on mouse B-lymphocytes. J. Immunol. 108, 1319.

159. Perlmann P., Perlmann H. & Biberfeld P. (1972) Specifically cytotoxic lymphocytes produced by preincubation with antibody-complexed target cells. J. Immunol. 108, 558.

160. Perlmann P., Perlmann H. & Wigzell H. (1972) Lymphocyte mediated cytotoxicity in vitro. Induction and inhibition by humoral antibody and nature of effector cells. Transpl. Rev. 13, 91.

161. Premkumar-Reddy E., Price P. J. & Chung K. C. (1976) Continuous culturing of murine splenic B-lymphocytes: sythesis and surface deposition of IgM and putative IgD molecules. Cell 8, 397.

162. Rask R. L., Klareskog L., Ostberg L. & Peterson P. A. (1975) Isolation and properties of a murine spleen cell Fc-receptor. Nature 257, 231.

163. Revoltella R., Pediconi M., Bertolini L. & Bosman C. (1975) In vitro immune response by murine bone marrow cells stimulated against soluble immune complexes. Cell. Immunol. 20, 117.

164. Reynolds H. Y., Atkinson J. P., Neuball H. H. & Frank M. M. (1975) Receptors for immunoglobulin and complement on human alveolar macrophages. J. Immunol. 114, 1813.

165. Rhodes J. (1975) Receptor for monomeric IgM on guinea pig splenic macrophages. Nature 243, 527.

166. Rodbard D. & Bertino R. E. (1973) Theory of radioimmunoassays and hormone-receptor interactions: II. Simulation of antibody divalency, cooperativity and allosteric effects In: Advances in Experimental Medicine and Biology 36, 327. Receptors for reproductive Hormones. Malley B. & Means A.R. Plenum-Press, New York-London.

167. Rodenwald R. (1973) Intestinal transport of antibodies in the newborn rat. J. Cell. Biol. 58, 189.

168. Roitt M. (1972) Essential Immunology. Blackwell, Oxford.

169. Rosenthal H. E. (1967) A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. Anal. Biochem. 20, 525.

170. Ross G. D., Polley M. J., Rabellino E. M. & Grey H. M. (1973) Two different complement receptors in human lymphocytes. One specific for C3b and one specific for C3b inactivator cleaved C3b. J. Exp. Med. 138, 798.

171. Rossi G., Newman S. A. & Metzger H. (1977) Assay and partial characterization of the solubilized cell receptor for immunoglobulin E. J. Biol. Chem. 252, 704.

172. Sandermann H. jr. (1978) Regulation of membrane enzymes by lipids. Biochim. Biophys. Acta 515, 209.

173. Sarmay G., Sanderson A. & Ivanyi J. (1979) Modulation of Fc-receptors on human peripheral blood lymphocytes by antisera against β_2 microglobulin, Ia or immunoglobulin. Immunology 36, 339.

174. Scatchard G. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660.

175. Scherzer H. & Ward P. A. (1978) Lung injury produced by immune complexes of varying composition. J. Immunol. 121, 947.

176. Schorlemmer H. U. & Allison A. C. (1976) Effect of activated complement components on enzyme secretion by macrophages. Immunology 31, 781.

177. Schneck J., Rosen O. M. Diamond B. & Bloom B. R. (1981) Modulation of Fc-receptor expression and Fc-mediated phagocytosis in variants of a macrophage-like cell line. J. Immunol. 126, 745.

178. Schwarz G. (1977) On the analysis of linear binding effects associated with curved Scatchard plots. Biophysical Chemistry 6, 65.

179. Sedlacek H. H. (1980) Pathophysiological aspects of immune complex diseases I. Interaction with plasma enzyme systems, cell membranes and the immune response. Klin. Wochenschr. 58, 1.

180. Sedlacek H. H. (1980) Pathophysiological aspects of immune complex diseases II. Phagocytosis, exocytosis and pathogenic depositions. Klin. Wochenschr. 58, 9.

181. Sedmak J. J. & Grossberg S. E. (1977) A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G-250. Anal. Biochem. 79, 544.

182. Segal D., Sharrow S., Jones J. F. & Siraganian R. P. (1981) Fc (IgG) receptors on rat basophilic leukemia cells. J. Immunol. 126, 138.

183. Segal D. M., Taurog J. D. & Metzger H. (1977) Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2993.

184. Sethi K. K. & Brandies H. (1980) IgG Fc-binding receptors on spermatozoa. Eur. J. Immunol. 10, 964.

185. Singer S. J. (1957) Physical-chemical studies on the nature of antigen-antibody reactions. J. Cell. Comp. Physiol. 50, 51.

186. Siraganian R. P., Hook W. A. & Levine B. B. (1975) Specific in vitro histamine release from basophils by bivalent haptens: evidence for activation by simple bridging of membrane bound antibody. Immunochemistry 12, 149.

187. Siré J., Kahn-Perles B., Collé A. & Bourgeois A. (1980) Biochemical characterization of an Fc-receptor of rabbit lymphocytes. Eur. J. Immunol. 10, 116.

188. Smith M. H. (1970) Peptides and Proteins. Molecular weight of proteins and some other materials including sedimentations, diffusion and frictional coefficients and partial specific volumes. In: Handbook of Biochemistry. Selected data for molecularbiology. 2 nd edition. Sober H. A. (Hrsg.) The Chemical Rubber Co. S. 3.

189. Sobotka A. K., Dembo M., Goldstein B. & Lichtenstein L. M. (1979) Antigen-specific desensitization of human basophils. J. Immunol. 122, 511.

190. Solheim B. G., Thorsby E. & Möller, E. (1976) Inhibition of the Fc-receptor of human lymphoid cells by antisera recognizing determinants of the HLA-system. J. Exp. Med. 143, 1568.

191. Stanworth D. R., King S. M., Roy P. D., Moran J. M. & Moran D. M. (1979) Synthetic peptides comprising sequences of the human immunoglobulin E heavy chain capable of releasing histamine. Biochem. J. 180, 665.

192. Stout R. D., Murphy D. B., Mc Devitt H. O. & Herzenberg L. A. (1977) The Fc-receptor on thymus derived lymphocytes IV. Inhibition of binding of antigen-antibody complexes to Fc-receptor positive T-cells by anti-Ia sera. J. Exp. Med. 145, 187.

193. Sulica A., Gherman M., Medesan C., Sjöquist J. & Ghetie V. (1979) IgG-binding sites on macrophage cell membrane I. Identification of two distinct Fc-receptors on mouse peritoneal macrophages. Eur. J. Immunol. 9, 979.

194. Suzuki T., Sadasivan R., Saito-Taki T., Stechschulte D. J., Balentine L. & Helmkamp G. M. (1980) Studies of Fc-receptors on human B-lymphocytes: Phospholipase A_2 activity of Fc-γ-receptors. Biochemistry 19, 6037.

195. Takatsu K., Ishizaka K. & Ishizaka T. (1975) Biological significance of disulfid bonds in human IgE-molecules. J. Immunol. 114, 1838.

196. Taurog. J. D., Mendoza G. R., Hook W. A., Siraganian R. P. & Metzger H. (1977) Noncytotoxic IgE-mediated release of histamine and serotonin from murine mastocytoma cells. J. Immunol. 119, 1757.

197. Tesch H. & König W. (1980) Phospholipase A_2 and arachidonic acid: a common link in the generation of the eosinophil chemotactic factor (ECF) from human PMN by various stimuli. Scand. J. Immunol. 11, 409.

198. Tesch H., König, W. & Frickhofen N. (1979) Eosinophil chemotactic factor. Release from human polymorphnuclear neutrophils by arachidonic acid.
Int. Archs Allergy appl. Immunol. 58, 436.

199. Teshima H., Wanebo H., Pinsky C. & Day N. K. (1977) Circulating immune complexes detected by ^{125}J-C1q deviation test in sera of cancer patients.
J. Clin. Invest. 59, 1134.

200. Theobald K. & König W. (1981) Characterization of a serum factor with inhibitory and enhancing activity on the passive cutaneous anaphylactic reaction.
Fed. Proc. 40, 4491.

201. Theofilopoulos A. N., Wilson C. B. & Dixon F. J. (1976) The Raji cell radioimmune assay for detecting immune complexes in human sera. J. Clin. Invest. 57, 169.

202. Thoenes J. & Stein H. (1979) Properties of an Fc-γ-binding protein isolated from human leukemic B cells.
J. Exp. Med. 150, 1049.

203. Tigelaar R. E., Vaz N. M. & Ovary Z. (1971) Immunoglobulin receptors on mouse mast cells. J. Immunol. 106, 661.

204. Tong Liu F., Bohn J. W., Ferry E. L., Yamamoto H., Molinaro C. A., Sherman L. A. Klinman N. R. & Katz, D. H. (1980) Monoclonal dinitrophenyl specific murine IgE antibody: preparation, isolation and characterization.
J. Immunol. 124, 2728.

205. Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350.

206. Unkeless J. C. (1977) The presence of two Fc-receptors on mouse macrophages: evidence from a variant cell line and differential trypsin sensitivity.
J. Exp. Med. 145, 931.

207. Unkeless J. C. (1980) Mouse macrophage Fc-receptors. J. Retic. Endothel. Soc. 28, 11.

208. Uvnäs B. (1967) Mode of binding and release of histamine in mast cell granules from the rat. Fed. Proc. 26, 219.

209. Walker W. S. (1976) Separate Fc-receptors for immunoglobulins IgG2a and IgG2b on an established cell line of mouse macrophages. J. Immunol. 116, 911.

210. Weber K. & Osborne M. (1969) The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406.

211. Weigle W. O. & Maurer P. H. (1957) The molecular ratios of soluble rabbit antigen-antibody complexes. J. Immunol. 79, 223.

212. Weigle W. O. & Maurer P. H. (1957) The effect of complements on soluble antigen-antibody complexes. J. Immunol. 79, 211.

213. Well J. V. (1980) Immune mechanisms in tissue damage. In: Basic & Clinical Immunology, Fudenberg H. H. (Hrsg.) Kap. 16, S. 191, Lange Medical Publications.

214. Wellek B., Hahn H. & Opferkuch W. (1975 Quantitative contributions of IgG, IgM and C_3 to erythrophagocytosis and rosette formation by peritoneal macrophages, and anti-opsonin activity of dextran sulfate 500. Eur. J. Immunol. 5, 378.

215. Wernet P. & Kunkel H. G. (1975) Immunochemical aspects of Ia type B cell membrane specificities (Hl-B) as candidates for a human MLC stimulator antigen system: molecular heterogeneity and distinction from the Fc-receptors. Histocompatibility Testing, Munksgaard, Copenhagen, S. 731.

216. Wilson C. B. & Dixon F. J. (1971) Quantitation of acute and chronic serum sickness in the rabbit. J. Exp. Med. 134, 7.

217. Winkelhake J. L. (1978) Immunoglobulin structure and effector functions. Immunochemistry 15, 695.

218. Wood G. W. & Amare M. (1978) Expression of IgG Fc-receptors of human plasma cells. Immunological Communications 7, 13.

219. Yoshida T. O. & Anderson B. (1972) Evidence for a receptor recognizing antigen complexed immunoglubulin on the surface of activated mouse thymus lymphocytes. Scand. J. Immunol. 1, 401.

220. Zubler R. H., Nydegger U., Perrin L. H., Fehr K., Mc Cormick J., Lambert P. H. & Miescher P. A. (1976) Circulating and intraarticular immune complexes in patients with rheumatoid arthritis. J. Clin. Invest. 57, 1308.

L E B E N S L A U F

01.03.51	Geboren in Marl/Kreis Recklinghausen als Sohn des Paul Möller und seiner Ehefrau Margarete, geb. Grewe.
April 1957	Einschulung in die Volksschule in Marl
Dezember 1957	Einschulung in die Volksschule in Opladen
1961 - 1969	Besuch des Landrat-Lucas-Gymnasiums in Opladen
10.09.69	Ablegen des Abiturs
23.01.69	Musterung und Zuweisung zur Ersatzreserve II
Wintersemester 1969/70	Studium an der Pädagogischen Hochschule in Köln
Sommersemester 1970 - 1976	Studium der Biologie an der Universität Tübingen
06.10.76	Diplomprüfung im Fach Biologie. Fächerkombination: Mikrobiologie (Hptf.), Genetik (Nbf.), Biochemie (Nbf.) und Humangenetik (Nbf.). Titel der Diplomarbeit: Bestimmung von Influenza A-IgM-Antikörpern nach Absorption von IgG durch Staphylococcus aureus, Stamm Cowan I
Sommersemester 1977	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft im immunologischen Labor von Prof. Dr. Bessler am mikrobiologischen Institut der Universität Tübingen

01.12.77	Beginn der Promotion im Institut für medizinische Mikrobiologie der Universität Mainz bei Prof. Dr. König (Direktor: Prof. Dr. Klein)
Mai 1979	Zusammen mit meinem Doktorvater Wechsel zur Ruhr-Universität Bochum, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie (Direktor: Prof. Dr. Opferkuch)
Juli 1981	Antrag auf Zulassung zur Promotion beim Fachbereich Biologie der Universität Bochum eingereicht